



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-304989

(43)公開日 平成5年(1993)11月19日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 35/78	A D U	7180-4C		
C 1 2 N 5/10		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数16(全 49 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平4-249118	(71)出願人	000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号
(22)出願日	平成 4 年(1992) 9 月18日	(72)発明者	設楽 研也 東京都町田市中町 3 - 9 - 11
(31)優先権主張番号	特願平3-238375	(72)発明者	花井 陳雄 神奈川県相模原市富士見 3 - 3 - 3 - 202
(32)優先日	平 3 (1991) 9 月18日	(72)発明者	長谷川 護 神奈川県川崎市麻生区片平 1 - 9 - 26
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(72)発明者	桑名 良寿 東京都町田市旭町 3 - 6 - 6
		(72)発明者	宮地 宏昌 東京都町田市成瀬 2 - 11 - 2

(54)【発明の名称】 ヒト型キメラ抗体の製造法

(57)【要約】

【目的】 マウス抗体可変領域のアミノ酸配列が全く変化しないヒト型キメラ抗体の製造方法を提供する。

【構成】 ヒト抗体重鎖定常領域をコードするcDNAを挿入したカセットベクターにヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAを、ヒト抗体軽鎖定常領域をコードするcDNAを挿入したカセットベクターにヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAを、ヒト抗体の定常領域の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物の抗体の可変領域の3'末端側の塩基配列とからなり制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いてそれぞれ挿入し、これらのカセットベクターを動物培養細胞に導入し、該動物培養細胞を培地中に培養し、培養物中にヒト型キメラ抗体を生成蓄積させ、該培養物からヒト型キメラ抗体を採取する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) ①ヒト抗体重鎖定常領域をコードするcDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入することによりカセットベクターを構築し、該カセットベクターにヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAを挿入するためのクローニングサイトを設け、②ヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAを制限酵素を用いて切り出し、③得られたヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAを、ヒト抗体重鎖定常領域の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域の3'末端側の塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて該カセットベクターに挿入することにより、該合成DNAを介してヒト抗体重鎖定常領域をコードするcDNAとヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAとが結合挿入されたヒト型キメラ抗体重鎖発現ベクターを構築し、(2) ①ヒト抗体軽鎖定常領域をコードするcDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入することによりカセットベクターを構築し、該カセットベクターにヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAを挿入するためのクローニングサイトを設け、②ヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAを制限酵素を用いて切り出し、③得られたヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAを、ヒト抗体軽鎖定常領域の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域の3'末端側の塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて該カセットベクターに挿入することにより、該合成DNAを介してヒト抗体軽鎖定常領域をコードするcDNAとヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAとが結合挿入されたヒト型キメラ抗体軽鎖発現ベクターを構築し、(3) ①これらの発現ベクターを動物培養細胞に導入し、②該動物培養細胞を培地中に培養し、培養物中にヒト型キメラ抗体を生成蓄積させ、該培養物からヒト型キメラ抗体を採取することを特徴とするヒト型キメラ抗体の製造法。

【請求項2】 ヒト以外の動物がマウスである請求項1記載の製造法。

【請求項3】 ヒト以外の動物の抗体が、ガングリオシドに対する抗体である請求項1記載の製造法。

【請求項4】 ヒト以外の動物の抗体が、ガングリオシドGD<sub>3</sub>に対する抗体である請求項1記載の製造法。

【請求項5】 ヒト以外の動物の抗体が、マウスガングリオシドGD<sub>3</sub>に対する抗体である請求項1記載の製造法。

【請求項6】 抗体の重鎖可変領域が配列番号4記載のアミノ酸配列のうち1～120番目のアミノ酸配列を含み、抗体の軽鎖可変領域が配列番号5記載のアミノ酸配列のうち1～108番目のアミノ酸配列を含む請求項1記載の製造法。

【請求項7】 ヒト型キメラ抗体がガングリオシドGD<sub>3</sub>

に反応する抗体である請求項1記載の製造法。

【請求項8】 ヒト型キメラ抗体がガングリオシドGD<sub>3</sub>に反応する抗体KM-871である請求項1記載の製造法。

【請求項9】 ガングリオシドGD<sub>3</sub>および3',8'-LD1に反応するマウスモノクローナル抗体KM-641 (FERM BP-3116) の可変領域とヒト抗体定常領域とからなるヒト型キメラ抗体。

【請求項10】 ガングリオシドGD<sub>3</sub>に反応するヒト型キメラ抗体。

10 【請求項11】 ガングリオシドGD<sub>3</sub>に反応するヒト型キメラ抗体KM-871。

【請求項12】 ガングリオシドGD<sub>3</sub>および3',8'-LD1に反応するマウスモノクローナル抗体KM-641 (FERM BP-3116) の可変領域とヒト抗体定常領域とからなるヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株。

【請求項13】 ガングリオシドGD<sub>3</sub>に反応するヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株。

20 【請求項14】 ガングリオシドGD<sub>3</sub>に反応するヒト型キメラ抗体KM-871を生産する形質転換株KM-871 (FERM BP-3512)。

【請求項15】 配列番号7記載の塩基配列を含むDNA。

【請求項16】 配列番号8記載の塩基配列を含むDNA。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒト型キメラ抗体の製造法に関する。ヒト型キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体に比べて患者体内で抗マウス免疫グロブリン抗体ができないため、副作用が減少し、血中半減期も伸び、ヒト癌治療等においてマウスモノクローナル抗体より優れた治療効果が得られると期待される。

## 【0002】

【従来の技術】 一般にマウス抗体をヒトに投与すると、異物として認識されることによりヒト体内に抗マウス免疫グロブリン抗体ができてしまい、投与されたマウス抗体と反応し、副作用を引き起こしたり〔ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー(J. Clin. Oncol.) 2, 881(1984)、ブラッド(Blood) 65, 1349-1363(1985)、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Natl. Cancer Inst.) 80, 932(1988)、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 82, 1242(1985)〕、抗体が早くクリアランスされ〔ジャーナル・オブ・ニュクレアー・メディシン(J. Nucl. Med.) 26, 1011(1985)、ブラッド(Blood) 65, 1349-1363(1985)、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Natl. Cancer Inst.) 80, 937(1988)〕、その効果を減じてしまうことが知られている〔ジャーナル・オブ・イミュノロジー(J. Immunol.) 135, 1530(1985)、

キャンサー・リサーチ(Cancer Res.) 46, 6489(1986)〕。マウスモノクローナル抗体をヒト型キメラ抗体にすると、ヒト抗マウスIgG抗体はほとんど惹起されず、ヒトにおける血中半減期が6倍伸びることが報告されている〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 86, 4220(1989)〕。また、マウス抗体のFc領域はヒト抗体Fc領域に比べヒト補体やヒトエフェクター細胞を十分に活性化しない可能性がある。例えば、ガングリオシドGD<sub>2</sub>に対するマウスモノクローナル抗体は、ヒト抗体Fc領域を持つキメラ抗体に変換するとヒトエフェクター細胞を介した抗腫瘍効果が上昇することが報告されている〔ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.) 144, 1382-1386(1990)〕。

【0003】ガングリオシドは動物の細胞膜を構成している糖脂質の1種で、親水性側鎖である糖鎖と、疎水性側鎖であるスフィンゴシンおよび脂肪酸とから構成される分子である。ガングリオシドの発現は、細胞種、臓器種、動物種等によって異なることが知られている。さらに細胞が癌化する過程においては、発現しているガングリオシドが量的および質的变化を起こすことが明らかになった〔キャンサー・リサーチ(Cancer Res.) 45, 2405(1985)〕。例えば、悪性度が高いといわれている神経外胚葉系腫瘍である神経芽細胞腫、肺小細胞癌およびメラノーマでは、正常細胞にはほとんど認められないガングリオシドGD<sub>2</sub>, GD<sub>3</sub>, GM<sub>2</sub>等が発現していることが報告されている〔ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディスン(J. Exp. Med.) 155, 1133(1982)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 257, 12752(1982)、キャンサー・リサーチ(Cancer Res.) 47, 225(1987)、同47, 1098(1987)、同45, 2642(1985)、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 80, 5392(1983)〕。

【0004】ガングリオシドGD<sub>2</sub>は神経外胚葉系腫瘍の中でも特にメラノーマにおいてその発現が多く認められ、これまでにマウスIgMクラスおよびIgGクラスに属する抗GD<sub>2</sub>モノクローナル抗体が知られている〔インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー(Int. J. Cancer) 29, 269(1982)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 257, 12752(1982)、キャンサー・リサーチ(Cancer Res.) 47, 225(1987)、アクタ・ニューロパソロジー(Acta Neuropathol.) 79, 317(1989)、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 77, 6114(1980)、ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディスン(J. Exp. Med.) 155, 1133(1982)、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 81, 5767(1984)〕。

【0005】特願平2-334659に開示されているKM-641(FERM BP-3116)は、マウスIgG3クラスに属する抗GD<sub>2</sub>モノクローナル抗体であり、ガングリオシドGD<sub>2</sub>ばかりでなくガングリオシド3',8'-LD1とも反応し、広い抗腫瘍スペクトラムを有する。また、KM-641は、J. Exp. Med. 155, 1133(1982)記載の抗GD<sub>2</sub>モノクローナル抗体R24よりも強い結合活性を有しており、強力な抗腫瘍活性を示す。

【0006】ガングリオシドGD<sub>2</sub>に対するマウスモノクローナル抗体R24は、メラノーマの治療に用いられたことがあるが、患者の体内に抗マウスIgG抗体ができ、投与されたマウスモノクローナル抗体R24の効果を減じてしまうことが報告されている〔ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・キャンサー・アンド・クリニカル・オンコロジー(Eur. J. Cancer Clin. Oncol.) 24, suppl 2, s65(1988)〕。

【0007】従って、抗GD<sub>2</sub>モノクローナル抗体についても、キメラ抗体ができれば、患者体内で抗マウスIgG抗体ができず、副作用が減少し、血中半減期も伸び、さらには抗腫瘍エフェクター効果も増大し、ヒト癌治療において、マウスモノクローナル抗体より優れた治療効果が得られると期待される。ヒト型キメラ抗体の製造法に関しては、マウスモノクローナル抗体の重鎖(以下H鎖と略記する)および軽鎖(以下L鎖と略記する)の定常領域部分をヒト型に変換したヒト型キメラ抗体を、組換えDNA技術を用いて、動物細胞において産生させる方法が知られている。すなわち、マウスH鎖可変領域(以下V<sub>H</sub>と略記する)およびL鎖可変領域(以下V<sub>L</sub>と略記する)をコードする遺伝子として、染色体DNAを用いてヒト型キメラ抗体を産生する方法

〔モリソン(Morrison)ら、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 81, 6851(1984)、ニューバーガー(Neuberger)ら、ネイチャー(Nature) 314, 268(1985)、西村ら、キャンサー・リサーチ(Cancer Res.) 47, 999(1987)、ドライ(Dorai)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.) 139, 4232(1987)、亀山ら、フェデレーション・オブ・ヨーロッパ・バイオケミカル・ソサイエティーズ(FEBS Letters) 244, 301(1989)〕および、cDNAを用いてヒト型キメラ抗体を産生する方法が知られている〔ギリス(Gillies)ら、ジャーナル・イムノロジカル・メソッド(J. Immunol. Methods) 125, 191(1989)、リュウ(Liu)ら、特表平2-501886〕。ハイブリドーマ細胞からのマウスV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードする染色体DNAのクローニングと塩基配列の決定は、マウスV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定に比べ時間と労力がかかる。従って、染色体DNAを用いるヒト型キメラ抗体の製造法よりも、cDNAを用いるヒト型キメラ抗体の製造法が望ましい。

【0008】ギリス(Gillies)らはマウスV<sub>H</sub>をコー

ドするcDNAとヒトC<sub>H</sub>をコードする染色体DNAを結合させたヒト型キメラH鎖遺伝子およびマウスV<sub>L</sub>をコードするcDNAとヒトC<sub>L</sub>をコードする染色体DNAを結合させたヒト型キメラL鎖遺伝子を、動物細胞用の発現ベクターに挿入し、ヒト型キメラ抗体を動物細胞において発現させた〔ジャーナル・イミュノロジカル・メソッズ(J. Immunol. Methods) 125, 191(1989)〕。しかしながら、いくつかの抗体のキメラ化を試みたところ、リーダー配列を変換しないとL鎖が発現しないキメラ抗体があるという問題点があった。さらに、ヒトC<sub>H</sub>およびC<sub>L</sub>をコードする染色体DNAの代わりにヒトC<sub>H</sub>およびC<sub>L</sub>をコードするcDNAを用いたヒト型キメラ抗体の製造法の方がより簡便である。

【0009】リュウ(Liu)らは特表平2-501886において、マウスV<sub>H</sub>をコードするcDNAとヒトC<sub>H</sub>をコードするcDNAを結合させたキメラH鎖cDNAおよびマウスV<sub>L</sub>をコードするcDNAとヒトC<sub>L</sub>をコードするcDNAを結合させたL鎖cDNAを、動物細胞用の発現ベクターに挿入し、動物細胞においてヒト型キメラ抗体を発現させることを示している。しかしながら、この方法では、マウスV<sub>H</sub>あるいはV<sub>L</sub>をコードするcDNAとヒトC<sub>H</sub>あるいはC<sub>L</sub>をコードするcDNAをマウス可変領域内のJ領域部にて結合させているため、V<sub>H</sub>をコードするcDNAのJ<sub>H</sub>部およびV<sub>L</sub>をコードするcDNAのJ<sub>L</sub>部のおおのをおを突然変異誘発により変更することを必要とする。また、マウスJk5を用いたキメラL鎖については、ヒト型キメラ化によりフレームワーク4部のアミノ酸の1つがロイシンからイソロイシンに変化してしまう。抗体の抗原との結合は、相補性決定領域(以下CDRと省略)のアミノ酸配列がとくに重要であるが、フレームワーク部分のアミノ酸配列の重要性も示されている。これに関して、リーヒマン(Riechmann)らはラット抗体のCDR部分をヒト抗体のフレームワーク部分に移植したCDR移植抗体を作製した結果、フレームワーク部の変換により抗体の結合活性は低下し、フレームワーク部のアミノ酸を一部変換することで抗体活性の向上が見られたと報告している〔ネイチャー(Nature) 332, 323(1988)〕。従って、Liuらの開示したマウスJk5を用いた製造法によるヒト型キメラ抗体は、抗体の結合活性が低下する可能性がある。従って、全てのマウス型抗体のヒト型キメラ化に際し、マウス抗体可変領域部のアミノ酸が全く変化しない簡便なヒト型キメラ抗体の産生法が望まれている。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ヒト型キメラ抗体の製造において、マウス抗体可変領域のアミノ酸配列を全く変化させずに、簡便にヒト型キメラ抗体を得ることができるヒト型キメラ抗体の製造法を提供することにある。さらには、当該方法を用いるガングリオシドGD<sub>3</sub>に対するヒト型キメラ抗体およびその製造法を提供することにある。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、(1) ①ヒト抗体重鎖定常領域をコードするcDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入することによりカセットベクターを構築し、該カセットベクターにヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAを挿入するためのクローニングサイトを設け、②ヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAを制限酵素を用いて切り出し、③得られたヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAを、ヒト抗体重鎖定常領域の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域の3'末端側の塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて該カセットベクターに挿入することにより、該合成DNAを介してヒト抗体重鎖定常領域をコードするcDNAとヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域をコードするcDNAとが結合挿入されたヒト型キメラ抗体重鎖発現ベクターを構築し、(2) ①ヒト抗体軽鎖定常領域をコードするcDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入することによりカセットベクターを構築し、該カセットベクターにヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAを挿入するためのクローニングサイトを設け、②ヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAを制限酵素を用いて切り出し、③得られたヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAを、ヒト抗体軽鎖定常領域の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域の3'末端側の塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて該カセットベクターに挿入することにより、該合成DNAを介してヒト抗体軽鎖定常領域をコードするcDNAとヒト以外の動物の抗体の軽鎖可変領域をコードするcDNAとが結合挿入されたヒト型キメラ抗体軽鎖発現ベクターを構築し、(3) ①これらの発現ベクターを動物培養細胞に導入し、②該動物培養細胞を培地中に培養し、培養物中にヒト型キメラ抗体を生成蓄積させ、該培養物からヒト型キメラ抗体を採取することを特徴とするヒト型キメラ抗体の製造法を提供する。

【0012】ここで用いるカセットベクターとは、動物細胞用発現ベクターにヒト定常領域をコードするcDNAを挿入したベクターであり、ヒト定常領域の上流にヒト以外の動物の抗体の可変領域をコードするcDNAを挿入するためのクローニングサイトを有している。このカセットベクターのクローニングサイトに、ヒト定常領域の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物の可変領域の3'末端側の塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて、ヒト以外の動物の抗体の可変領域を挿入することにより、容易にヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

【0013】以下に本発明を詳細に説明する。

#### 1. カセットベクターの構築

50 本発明で用いるカセットベクターは動物細胞用発現ベク

ターにヒト抗体定常領域をコードするcDNAを挿入することにより構築する。動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体定常領域をコードするcDNAを組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー(Cytotechnology) 3, 133(1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.) 101, 1307(1987)]、モロニーマウス白血ウイルスのLTR プロモーターとエンハンサー [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 960(1987)]、免疫グロブリンH鎖のプロモーター [セル(Cell) 41, 479(1985)] とエンハンサー [セル(Cell) 33, 717(1983)] 等があげられる。免疫グロブリンH鎖のプロモーターとエンハンサーは、抗体産生ハイブリドーマ細胞、例えば、特開昭60-258128に開示されている抗ヒト血清アルブミン抗体産生ラットハイブリドーマKM50細胞等を用いて作製することができる。以下に、KM50細胞を用いる免疫グロブリンH鎖のプロモーターとエンハンサーの作製法について説明する。

【0014】培養したKM50細胞、KM50の融合相手のP3X63Ag8U.1 (以下P3U1と略記する) 細胞(ATCC CRL1597)、およびラットの腎臓細胞より、モレキュラー・クローニング [(Molecular Cloning) 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press 刊、1989年、p9.14] に記載された方法に従ってそれぞれの染色体DNAを抽出する。次に、フェデレーション・オブ・ヨーロピアン・バイオケミカル・ソサイエティーズ(FEBS letter) 244, 301(1989) に記載の方法に従い、KM50細胞より抽出された染色体DNAより、DNA再配列が起こったKM50細胞中の活性型免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子、免疫グロブリンのプロモーターおよびエンハンサーを含むDNA断片を取得する。このDNA断片より免疫グロブリンのプロモーター部分およびエンハンサー部分を切り出し、上記動物細胞用発現ベクターに挿入する。免疫グロブリンH鎖のプロモーターとエンハンサーを有する動物細胞用発現ベクターの具体例としては、例えば、プラスミドpIg1SE1d4等があげられる。

【0015】次に、カセットベクターのヒト定常領域の上流に、ヒト以外の動物の抗体の可変領域をコードするcDNAを挿入するためのクローニングサイトを設ける。このクローニングサイトにヒト以外の動物の抗体の可変領域をコードするcDNAを、ヒト抗体の定常領域の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物の可変領域の3'末端側の塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて挿入することにより、該合成DNAを介してヒト抗体定常領域をコードするcDNAとヒト以外の動物の抗体の可変領域をコードするcDNAとが結合挿入されたヒト型キメラ抗体発現ベクターを製造することができ

る。ここで用いる合成DNAは、ヒト抗体の定常領域の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物の可変領域の3'末端側の塩基配列に基づいて、DNA合成機を用いて製造する。クローニングサイトが設けられたカセットベクターの具体例としては、例えば、ヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターを構築するために用いるカセットベクターpChiIgHB2、ヒト型キメラ抗体L鎖発現ベクターを構築するために用いるカセットベクターpChiIgLA2等があげられる。

10 【0016】ヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターを構築するために用いるカセットベクターは、例えば、ヒトC<sub>H</sub>をコードするcDNAを、5'末端付近のApa I部位より3'末端まで切り出し、プラスミドpIg1SE1d4等の動物細胞用発現ベクターに挿入することにより構築する。このカセットベクターに、ヒト以外の動物のV<sub>H</sub>をコードするcDNAを挿入するためのクローニングサイトを設け、このクローニングサイトに、ヒト抗体C<sub>H</sub>の5'末端からApa I部位までの塩基配列とヒト以外の動物の抗体のV<sub>H</sub>の3'末端側の塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて、適当な制限酵素により切り出したヒト以外の動物の抗体のV<sub>H</sub>をコードするcDNAを挿入することで、発現したときにV<sub>H</sub>のアミノ酸配列に変化を生じないようなヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターを容易に取得できる。

20 【0017】ヒト型キメラ抗体L鎖発現ベクターを構築するために用いるカセットベクターは、例えば、ヒトC<sub>L</sub>をコードするcDNAを、5'末端付近に突然変異誘発によりEcoRV部位を導入し、EcoRV部位より3'末端まで切り出し、プラスミドpIg1SE1d4等のプラスミドに挿入することにより構築する。このカセットベクターに、ヒト以外の動物の抗体のV<sub>L</sub>をコードするcDNAを挿入するためのクローニングサイトを設け、このクローニングサイトに、ヒト抗体C<sub>L</sub>の5'末端からEcoRV部位までの塩基配列とヒト以外の動物の抗体のV<sub>L</sub>の3'末端側の塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて、適当な制限酵素により切り出したヒト以外の動物の抗体のV<sub>L</sub>をコードするcDNAを挿入することで、発現したときにV<sub>L</sub>のアミノ酸配列に変化を生じないようなヒト型キメラ抗体L鎖発現ベクターを容易に取得できる。

30 【0018】上記ヒトC<sub>H</sub>およびヒトC<sub>L</sub>をコードするcDNAは、セル(Cell) 22, 197(1982)等の開示されており、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 79, 7025(1985)、同82, 7025(1985)等に記載された方法に従って、ヒト抗体産生ミエローマ細胞、ヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞、ヒト型キメラ抗体産生細胞 [SP2-PC Chimera: フェデレーション・オブ・ヨーロピアン・バイオケミカル・ソサイエティーズ(FEBS letter) 244, 301(1989)] 等より取得できる。すなわち、

上記細胞からモレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版、1989年、p8.1に記載された方法に従い mRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版、1989年、p8.1、1.53に記載された方法に従い、ベクターとしてファージあるいはプラスミドを用いてライブラリーを作成する。次に、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版、1989年、p8.1、1.53に記載された方法に従い、該ライブラリーより、ヒト抗体の定常領域部分あるいは可変領域部分をプローブとして用い、ヒトC<sub>H</sub>をコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびヒトC<sub>L</sub>をコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドを得る。ヒトC<sub>H</sub>をコードするcDNAおよびヒトC<sub>L</sub>をコードするcDNAの塩基配列は、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版、1989年、p13.1に記載された方法で決定する。ヒトC<sub>L</sub>をコードするcDNAへの適当な制限酵素部位の導入、例えば、5'末端付近へのEcoRV部位の導入は、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版、1989年、p15.1に記載された方法で行う。

#### 【0019】2. ヒト型キメラ抗体の産生

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗GD<sub>3</sub>モノクローナル抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>をコードするcDNAは、以下のようにして取得する。

【0020】マウス抗GD<sub>3</sub>モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、例えば、マウス抗GD<sub>3</sub>モノクローナル抗体KM-641(FERM BP-3116)等よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを、ベクターとしてファージあるいはプラスミドを用いてライブラリーを作成する。該ライブラリーより、ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の定常領域部分あるいは可変領域部分をプローブとして用い、V<sub>H</sub>をコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミド、およびV<sub>L</sub>をコードするcDNAを有する組換えファージあるいは組換えプラスミドを得る。上記と同様にV<sub>H</sub>をコードするcDNAおよびV<sub>L</sub>をコードするcDNAの塩基配列を決定する。

【0021】V<sub>H</sub>をコードするcDNAを5'末端から3'末端付近にある適当な制限酵素部位(以下、A部位と称する)まで切り出し、これをヒト抗体のC<sub>H</sub>の5'末端側の塩基配列とヒト以外の動物のV<sub>H</sub>の3'末端からA部位までの塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて、上記カセットベクターのクローニングサイトに挿入し、該合成DNAを介してヒト抗体C<sub>H</sub>をコードするcDNAとヒト以外の動物の抗体のV<sub>H</sub>をコードするcDNAとを結合させることによりヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターを構築する。同様に、V<sub>L</sub>をコードするcDNAを5'末端から3'末端付近にある適当な制限酵素部位(以下、B部位と称する)まで切り出し、これをヒト抗体のC<sub>L</sub>の5'末端側の塩基配列とヒト以外の

動物のV<sub>L</sub>の3'末端からB部位までの塩基配列とからなり、制限酵素部位を両端に有する合成DNAを用いて、上記カセットベクターのクローニングサイトに挿入し、該合成DNAを介してヒト抗体C<sub>L</sub>をコードするcDNAとヒト以外の動物の抗体のV<sub>L</sub>をコードするcDNAとを結合させることによりヒト型キメラ抗体L鎖発現ベクターを構築する。

【0022】ヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターとヒト型キメラ抗体L鎖発現ベクターとを宿主細胞に導入することにより、ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株を得ることができる。ヒト型キメラ抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト型キメラ抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581、以下SP2/0細胞と略記する)、マウスP3X63-Ag8.653(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(以下dhfrと略記する)が欠損したCHO細胞(Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 4216, (1980))等があげられる。

【0023】ヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターおよびヒト型キメラ抗体L鎖発現ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、特開平2-257891に開示されているエレクトロポレーション法により行うことができる。ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、G418および牛胎児血清を含むRPMI1640培地により選択する。ヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株の具体例としては、ガングリオシドGD<sub>3</sub>に反応するヒト型キメラ抗体を生産する形質転換株であるKM-871があげられる。KM-871は平成3年8月13日付で、工業技術院微生物工業技術研究所にFERM BP-3512として寄託されている。

【0024】形質転換株を培養するための培地は、目的とする抗体を生成、蓄積できるものであればいずれでも用いることができる。例えば、G418およびウシ胎児血清を含むRPMI1640があげられる。培養は該培地200 μl ~ 100 mlを用い、1 × 10<sup>5</sup> ~ 1 × 10<sup>7</sup> 細胞/mlの形質転換株を37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で1 ~ 7日間培養することにより行う。ヒト型キメラ抗体は培養物中に生成、蓄積する。培養物中のヒト型キメラ抗体の活性は酵素免疫抗体法(ELISA法: 抗体実験マニュアル、E. Harlowら編、Cold Spring Harbor Laboratory 刊、1988年)により測定する。形質転換株は、特開平2-257891に開示されている方法に従い、dhfr増幅系を利用してヒト型キメラ抗体の生産量を上昇させることができる。

【0025】ヒト型キメラ抗体は、上記培養物の上清よりプロテインAカラムを用いて精製することができる。

(抗体実験マニュアル、E. Harlowら編、Cold Spring Harbor Laboratory 刊、1988年)。このようにして得られるヒト型キメラ抗体の具体例としては、ガングリオシド



GD<sub>3</sub> に反応するヒト型キメラ抗体、例えば、ヒト型キメラ抗体KM-871等があげられる。

【0026】ヒト型キメラ抗体の反応性はELISA 法等で測定する。精製したヒト型キメラ抗体のH鎖、L鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) やウエスタンブロッティング法

(抗体実験マニュアル、E. Harlowら編、Cold Spring Harbor Laboratory 刊、1988年) 等で測定する。ガングリオシドGD<sub>3</sub> に反応するヒト型キメラ抗体の培養癌細胞株に対する結合活性は、蛍光抗体法、ELISA 法等により測定する。ヒト型キメラ抗体の培養癌細胞株に対する補体依存性殺細胞活性 (CDC 活性)、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC活性) は、免疫学実験入門 (松橋ら、学会出版センター刊、1981年) 記載の方法により測定する。

【0027】以下に、本発明の実施例および参考例を示す。

【0028】

【実施例】

【0029】実施例1 カセットベクターの構築

1. KM50細胞由来免疫グロブリンH鎖プロモーターおよびエンハンサー遺伝子の取得

(1) KM50細胞、P3U1細胞およびラット腎臓からの染色体DNA の調製

公知の方法 [マニアティス (Maniatis) ら編集、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、1989年、p 9.16] に従い、以下のようにして染色体DNA を調製した。

【0030】KM50細胞  $1.2 \times 10^8$  個、P3U1細胞 (ATCC CR L1597)  $2 \times 10^8$  個、ラット腎臓 (-80℃で凍結後、木槌で充分たたいて砕いたもの) 1.6gのそれぞれを2ml の10 mM トリス塩酸、150 mM 塩化ナトリウムおよび10mM エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム (以下EDTAと略記する) からなる緩衝液 (pH7.5) に懸濁し、この溶液にプロテイナーゼK (シグマ社製) 0.8mg とラウリル硫酸ナトリウム (以下SDS と略記する) 10mgを加えて37℃で一晩インキュベートした。次に等量のフェノールで1回、クロロホルムで2回、エーテルで1回抽出し、10mM トリス塩酸および1mMEDTAからなる緩衝液 (pH7.5) に一晩透析を行った。透析チューブよりDNA 溶液を回収し、これにリボスクレアーゼA (シグマ社製) を終濃度20  $\mu$ g/ml となるように加えた。この溶液を6時間、37℃にてインキュベートし、RNA を充分分解させた後に、15mgのSDS と1mg のプロテイナーゼKを加え、37℃で一晩インキュベートした。次に等量のフェノールで2回、クロロホルムで2回、エーテルで2回抽出し、10mM トリス塩酸および1mMEDTAからなる緩衝液 (pH7.5) に一晩透析を行った。透析チューブよりDNA 溶液を回収して、染色体DNA サンプルとした。DNAの濃度を260nm における吸光度で測定した結果、KM50細胞  $1.2 \times 10^8$  個より1.6mg、P3U1細胞  $2 \times 10^8$  個より1.5mg、ラット腎臓1.6gより1.9mg

の染色体DNA がそれぞれ得られた。

【0031】(2) サザンブロッティングによる、KM50細胞中における活性型免疫グロブリンH鎖遺伝子の同定

(1) で得られたKM50細胞、P3U1細胞、ラット腎臓の染色体DNA の各3  $\mu$ g ずつを10mM トリス塩酸 (pH7.5)、6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液25  $\mu$ l に溶解し、15単位のXba I (宝酒造社製、以下、制限酵素は宝酒造社製を使用した) を加え、37℃で2時間インキュベートし、Xba I 部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動にかけた後、サザンらの方法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 98, 503 (1975)] に従い、ニトロセルロースフィルターにDNA をトランスファーし、常法 [亀山ら、フェデレーション・オブ・ヨーロッパ・バイオケミカル・ソサイエティーズ (FEBS letter) 244, 301-306 (1989)] に従って、同文献記載のマウスJHプローブでハイブリダイゼーションを行った。KM50細胞のDNA においてのみ約9.3kbの位置にバンドが認められた。従って、この位置に存在する免疫グロブリンXba I 断片DNA が、KM50細胞中における活性型免疫グロブリンH鎖遺伝子をコードしていると考えられる。

【0032】(3) KM50細胞の染色体DNA ライブラリーの作製

(1) で得られたKM50細胞の染色体DNA 60  $\mu$ g を10mM トリス塩酸 (pH7.5)、6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液250  $\mu$ l に溶解し、150単位のXba I を加え、37℃で2時間インキュベートし、Xba I 部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画後、9.3kb の部分をDEAEペーパー法 [マニアティス (Maniatis) ら編集、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、1989年、p6.24] 等を用いて、KM50細胞の9.3kb DNA サンプルとして約2  $\mu$ g を回収した。一方ベクターとして用いるラムダーZAP (ストラタジーン社製) は3  $\mu$ g を10mM トリス塩酸 (pH7.5)、6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液200  $\mu$ l に溶解し、50単位のXba I を加え、37℃で2時間インキュベートし、Xba I 部位で切断した。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、DNA を約3  $\mu$ g 回収した。このDNA を100mM トリス塩酸 (pH7.5) 溶液100  $\mu$ l に溶解し、アリカリフォスファターゼ (宝酒造社製) 1単位を加えて、ベクターDNA の制限酵素切断末端の脱リン酸化反応を行った。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、DNA を2  $\mu$ g 回収した。このDNA を10mM トリス塩酸 (pH7.5) および1mMEDTA溶液10  $\mu$ l に溶解しベクターDNA サンプルとした。次にベクターDNA サンプルを0.2  $\mu$ g と、KM50細胞の9.3kb DNA サンプル0.2  $\mu$ g とを、66mM トリス塩酸 (pH7.5)、6.6mM 塩化マグネシウム、10mM βジチオスレイトール (以下DTT と略記する) および0.1mM アデノシン3



リン酸（以下ATPと略記する）からなる緩衝液（以下T4リガーゼ緩衝液と略記する）5  $\mu$ lに溶解し、T4DNAリガーゼ（宝酒造社製）175単位を加えて、3日間、4℃にてインキュベートした。この混合液のうち2  $\mu$ lを常法〔マニアティス(Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、1989年、p2.95〕に従い、ストラタジーン社製ギガパックゴールドを使用してラムダファージにパッケージングし、これを大腸菌BB4に感染させて、20万個のファージクローンを取得した。次にこのうち10万個のファージを常法〔マニアティス(Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、1989年、p2.112〕に従って、ニトロセルロースフィルター上に固定した。

【0033】(4) KM50細胞中において活性型となっている（抗ヒト血清アルブミン）免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子を含む組換えDNAの選択

(3)で作製した10万個のファージライブラリーより、亀山らの方法〔フェデレーション・オブ・ヨーロッパ・バイオケミカル・ソサイエティーズ(FEBS letter) 44, 301-306(1989)〕に従って<sup>32</sup>Pで標識したマウスJHプローブに、65℃において強く会合するクローンを2個取得した。常法〔マニアティス(Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、1989年、p2.118-2.169〕に従って、ファージDNAを回収したところ、9.3kbのKM50細胞の染色体DNAのXba I断片が組み込まれていた。

【0034】(5) KM50細胞中において活性型となっている（抗ヒト血清アルブミン）免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子の塩基配列

(4)で得られた2個のクローンについて、種々の制限酵素で消化し、制限酵素切断地図を作ったところ、全く同一のDNA断片(9.3kb)が挿入されていることが明らかとなった(図1)。そこで次にこのDNA断片9.3kbのうち、ラット免疫グロブリンH鎖のプロモーター領域および可変領域をコードしていると考えられる部分について、サンガー法〔サンガー(Sanger)ら、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 74, 5463(1977)、Amersham社 M13 cloning and sequencing handbook〕に従って塩基配列を決定した。配列番号1の中で、ATGCAAT等のオクタマー配列やTTGAAAA等のTATA box配列を含む部分は、免疫グロブリンのプロモーター領域と考えられる部分である。

【0035】2. KM50細胞中において活性型となっている（抗ヒト血清アルブミン）免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子のプロモーターとエンハンサーを用いた異種タンパク発現ベクターの構築

(1) pKMB11の構築

1の(5)で得られた9.3kbの免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子断片1  $\mu$ gを、10mMトリス塩酸(pH7.5)、6

mM塩化マグネシウムおよび100mM塩化ナトリウムからなる緩衝液30  $\mu$ lに溶解し、10単位のBgl IIとHind IIIを加え、37℃で2時間インキュベートし、Bgl IIとHind III部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、0.8kbの免疫グロブリンプロモーターを含むDNA断片を0.01  $\mu$ g回収した。次にプラスミドpBR322-Bgl III〔桑名(Kuwana)ら、フェデレーション・オブ・ヨーロッパ・バイオケミカル・ソサイエティーズ(FEBS letter) 219, 360(1987)〕の1  $\mu$ gを、10mMトリス塩酸(pH7.5)、6mM塩化マグネシウム、100mM塩化ナトリウムからなる緩衝液30  $\mu$ lに溶解し、10単位のBgl IIと10単位のHind IIIを加え、37℃で2時間インキュベートし、Bgl II部位とHind III部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約4.2kbのDNA断片を回収した。このようにして得たpBR322 Bgl II由来の約4.2kbのDNA断片(0.1  $\mu$ g)と、免疫グロブリンプロモーターを含むDNA断片0.01  $\mu$ gを、T4リガーゼ緩衝液20  $\mu$ lに溶解し、T4DNAリガーゼ（宝酒造社製）175単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応液を用いて大腸菌HB101株〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.) 41, 459(1969)〕をスコット(Scott)らの方法〔重定勝：細胞工学 2, 616(1983)〕に従って形質転換し、アンピシリン耐性（以下ApRと略記する）のコロニーを得、このコロニーよりプラスミドDNAを回収し、図2に示したpKMB11を得た。

【0036】(2) pKMD6の構築

免疫グロブリンプロモーター下流に適当な制限酵素部位を設けるため、(1)において構築したpKMB11のNco I部位からヌクレアーゼBAL31を用いて消化を行った。プラスミドpKMB11の10  $\mu$ gを10mMトリス塩酸(pH7.5)、6mM塩化マグネシウムおよび50mM塩化カリウムからなる緩衝液100  $\mu$ lに溶解し、30単位のNco Iを加え、37℃で2時間インキュベートし、Nco I部位で切断した。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿後、DNA断片を全量100  $\mu$ lのBAL31緩衝液〔20mMトリス塩酸(pH8.0)、600mM塩化ナトリウム、12mM塩化カルシウム、12mM塩化マグネシウムおよび1mM EDTAからなる緩衝液〕に溶解し、0.25単位のBAL31〔ベセスダリサーチラボラトリーズ(BRL)社製〕を加え、37℃で5秒間反応を行った。反応をフェノールで抽出することにより止め、クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させた後、DNAを1  $\mu$ g回収した。このDNA0.1  $\mu$ gと合成DNAリンカーSal I 0.01  $\mu$ gとをT4リガーゼ緩衝液20  $\mu$ lに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応液を用いて大腸菌HB101株をスコットらの方法によって形質転換し、ApRコロニーを得、このコロニーよりプラスミドDNAを回収し、図3に示したpKMD6を得た。このプラスミドのうち、BAL31にて消化を行った部分について、サンガー法に従って塩基配列を決定したところ免疫グロブリン

の開始コドンATGの上流に向かって3番目の塩基(配列番号1で303番目の塩基)まで除かれていた。

【0037】(3) pEPKMA1, pEPKMB1, pAGE501の構築  
免疫グロブリンの本来のプロモーターとエンハンサーは、その位置が離れている。従って異種タンパクを発現させるためのベクターとして、そのプロモーターとエンハンサーを接続したベクターを作っておくことが必要となる。そのために以下の操作を行った。

【0038】1の(5)で得られた9.3kbの免疫グロブリンH鎖可変領域遺伝子断片1 $\mu$ gを10mMトリス塩酸(pH7.5), 6mM塩化マグネシウムおよび100mM塩化ナトリウムからなる緩衝液30 $\mu$ lに溶解し、10単位のエコRVと10単位のXba Iを加え、37℃で2時間インキュベートし、EcoRV部位とXba I部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約1kbの免疫グロブリンエンハンサー領域を含むDNA断片を0.1 $\mu$ g回収した。一方(2)で得たプラスミドpKMD6の1 $\mu$ gを10mMトリス塩酸(pH7.5), 6mM塩化マグネシウムおよび100mM塩化ナトリウムからなる緩衝液100 $\mu$ lに溶解し、10単位のエコRVと10単位のXba Iを加え、37℃で2時間インキュベートし、EcoRV部位とXba I部位で切断した。フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、DNA断片を全量40 $\mu$ lのDNAポリメラーゼI緩衝液[50mMトリス塩酸(pH7.5), 10mM塩化マグネシウム, 0.1mM dATP(デオキシアデノシン3リン酸), 0.1mM dCTP(デオキシシチジン3リン酸), 0.1mM dGTP(デオキシグアノシン3リン酸)および0.1mM dTTP(デオキシチミジン3リン酸)からなる緩衝液]に溶解し、6単位の大腸菌DNAポリメラーゼIクレノー(Klenow)断片を加え、16℃で90分間反応させ、Bgl II消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノールで抽出することにより止め、クロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、DNA断片を10mMトリス塩酸(pH7.5), 6mM塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液30 $\mu$ lに溶解し、10単位のHindIIIを加え、37℃で2時間インキュベートし、HindIII部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約0.8kbの免疫グロブリンプロモーター領域を含むDNA断片を0.1 $\mu$ g回収した。次にプラスミドpUC18[メッシング(Messing)、メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)101, 20(1983)]の0.2 $\mu$ gを10mMトリス塩酸(pH7.5), 6mM塩化マグネシウムおよび100mM塩化ナトリウムからなる緩衝液30 $\mu$ lに溶解し、10単位のHindIIIと10単位のXba Iを加え、37℃で2時間インキュベートし、HindIII部位とXba I部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約2.7kbのDNA断片を0.1 $\mu$ g回収した。このようにして得たpKMD6由来の0.8kbのDNA断片(0.1 $\mu$ g)と、免疫グロブリンエンハンサー領域を含むDNA断片0.02 $\mu$ gと、pUC18の0.1 $\mu$ gとを、T4リガーゼ緩衝液20 $\mu$ lに溶解し、T4DNAリガーゼ175

単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、ApRコロニーを得、このコロニーよりプラスミドDNAを回収し、図4に示したpEPKMA1を得た。

【0039】次に、プラスミドpEPKMA1の1 $\mu$ gを10mMトリス塩酸(pH7.5), 6mM塩化マグネシウムおよび100mM塩化ナトリウムからなる緩衝液100 $\mu$ lに溶解し、10単位のXba Iを加え、37℃で2時間インキュベートし、Xba I部位で切断した。フェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、DNA断片を全量40 $\mu$ lのDNAポリメラーゼI緩衝液に溶解し、6単位の大腸菌DNAポリメラーゼIクレノー断片を加え、16℃で90分間反応させ、Xba I消化によって生じた5'突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノールで抽出することにより止め、クロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、DNA断片を回収した。このDNA断片と合成DNAリンカーXho I(宝酒造社製)の0.01 $\mu$ gを、T4リガーゼ緩衝液20 $\mu$ lに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、ApRコロニーを得、このコロニーよりプラスミドDNAを回収し、図5に示したpEPKMB1を得た。

【0040】次に、動物細胞用異種遺伝子発現ベクターpAGE107[宮地(Miyaji)ら、サイトテクノロジー(Cytotechnology) 3, 133-140(1990)]のSV40初期遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域(P<sub>SE</sub>と略記する)を、pEPKMB1の持つKM50由来免疫グロブリンH鎖プロモーターおよびエンハンサー(P<sub>H</sub>と略記する)に以下に示す方法により変換した。プラスミドpAGE107の1 $\mu$ gを10mMトリス塩酸(pH7.5), 6mM塩化マグネシウムおよび150mM塩化ナトリウムからなる緩衝液30 $\mu$ lに溶解し、10単位のSal Iと10単位のXho Iを加え、37℃で2時間インキュベートし、Sal I部位とXho I部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約5.95kbのG418耐性遺伝子等を含むDNA断片を0.5 $\mu$ g回収した。次に、プラスミドpEPKMB1の1 $\mu$ gを、10mMトリス塩酸(pH7.5), 6mM塩化マグネシウムおよび150mM塩化ナトリウムからなる緩衝液30 $\mu$ lに溶解し、10単位のSal Iと10単位のXho Iを加え、37℃で2時間インキュベートし、Sal I部位とXho I部位で切断した。該反応液をアガロースゲル電気泳動後、約1.7kbの免疫グロブリンプロモーターおよびエンハンサー領域を含むDNA断片を0.1 $\mu$ g回収した。このようにして得たpAGE107由来の5.95kbのDNA断片(0.1 $\mu$ g)と、免疫グロブリンプロモーターおよびエンハンサー領域を含むDNA断片0.02 $\mu$ gを、T4リガーゼ緩衝液20 $\mu$ lに溶解し、T4DNAリガーゼ175単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、ApRコロニーを得、このコロニーよりプラスミドDNAを回収し、図6に示したpAGE501を得た。

【0041】(4) pAGE109 の構築  
pAGE106 に2つあるEcoR I 切断部位の1つが除去されたプラスミドpAGE109 を以下のように構築した。

【0042】特開平3-22979 に記載の動物細胞用異種遺伝子発現ベクターpAGE106 の2  $\mu$ gを100  $\mu$ l の10mM トリスー塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoR I とSac I をそれぞれ加え、37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、EcoR I とSac I で切断したSV40初期遺伝子プロモーターおよびG418耐性遺伝子を含むpAGE106 のDNA 断片(4.3kb) を約1.5  $\mu$ g 回収した。次にこのDNA 断片を全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼ I 緩衝液に溶解し、5単位の大腸菌DNA ポリメラーゼ I ラージ断片を加え、16℃で2時間反応させ、Sac I 消化によって生じた3' 突出末端と、EcoR I 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出後、エタノールで沈澱させ、20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この混合溶液に更に350 単位のT4DNA リガーゼを加え、4℃で4時間反応を行った。このようにして得た組換えプラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図7に示したプラスミドpAGE109 を得た。

【0043】(5) pAGE502 の構築  
pAGE107 のSV40のプロモーターとエンハンサーを免疫グロブリンH鎖のプロモーターとエンハンサーに変換するために、プラスミドpAGE502 を以下のように構築した。

【0044】特開平3-22979 記載のpAGE107 の2  $\mu$ g を100  $\mu$ l の10mM トリスー塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のHindIII を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼ I 緩衝液に溶解し、5単位の大腸菌DNA ポリメラーゼ I クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、Hind III 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、30  $\mu$ l の10mM トリスー塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のXho I を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、Xho I とHindIII で切断したG418耐性遺伝子とApR 遺伝子を含むpAGE107 のDNA 断片(約5.95kb) を約1.5  $\mu$ g 回収した。

【0045】次に(3)で得られたpAGE501 の2  $\mu$ g を100  $\mu$ l の10mM トリスー塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび175mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のSal I を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼ I 緩衝液に溶解し、5単位の大腸菌DNA ポリメラーゼ

I クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、Sal I 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、30  $\mu$ l の10mM トリスー塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のXho I を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、Xho I とSal I で切断したKM50細胞の免疫グロブリンH鎖プロモーターおよびエンハンサー遺伝子を含むpAGE501 のDNA 断片(1.8kb) を約0.2  $\mu$ g 回収した。

【0046】次に上記で得られたpAGE107 のHindIII-Xho I 断片(約5.95kb)0.1  $\mu$ g と、pAGE501 のSal I-Xho I 断片(約1.8kb)0.1  $\mu$ g を全量20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更にT4DNA リガーゼ350 単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。このようにして得られた組換えプラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図8に示したプラスミドpAGE502 を得た。

【0047】(6) pAGE503 の構築  
pAGE502 に2つあるEcoR I 切断部位の1つが除去されたプラスミドpAGE503 を以下のように構築した。

【0048】(4)で得られたpAGE109 の2  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリスー塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のHindIII と10単位のCla I を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、Cla I とHindIII で切断したベクターグロビンとSV40初期遺伝子のポリAシグナル遺伝子を含むpAGE109 のDNA 断片(約1kb) を約0.2  $\mu$ g 回収した。

【0049】次に(5)で得られたpAGE502 の2  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリスー塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のHindIII と10単位のCla I を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、HindIII とCla I で切断したKM50細胞の免疫グロブリンH鎖プロモーター、エンハンサー遺伝子、ApR 遺伝子およびG418耐性遺伝子を含むpAGE502 のDNA 断片(約6.1kb)をDEAEペーパー法にて約1  $\mu$ g回収した。次に上記で得られたpAGE109 のHindIII-Cla I 断片(約1kb)0.1  $\mu$ gと、pAGE502 のHindIII-Cla I 断片(約6.1kb)0.1  $\mu$ g を全量20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更にT4DNA リガーゼ350 単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。このようにして得られた組換えプラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図9に示したプラスミドpAGE503 を得た。

【0050】(7) pSE1d1の構築  
pAGE107 にジハイドロフォレートレダクターゼ(dhfr) 遺伝子が導入されたプラスミドpSE1d1を以下のように構

築した。

【0051】特開平3-22979 記載のpAGE107 の2  $\mu$ g を100  $\mu$ l の100mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のエコRI を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼI 緩衝液に溶解し、5単位の大腸菌DNA ポリメラーゼI クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、EcoRI 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、30  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のHindIII を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、EcoRI とHindIII で切断したG418耐性遺伝子とApR 遺伝子を含むpAGE107 のDNA 断片(約5.6kb)を約1.5  $\mu$ g 回収した。

【0052】次にpSV2-dhfr [スブラマニ(Subramani)ら, モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biology) 1, 854(1981)] の2  $\mu$ g を100  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のBgl IIを加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱を行い、次に全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼI 緩衝液に溶解し、5単位の大腸菌DNA ポリメラーゼI クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、Bgl II消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、30  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のエコRI を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、Bgl IIとHindIII で切断したdhfr遺伝子を含むpSV2-dhfrDNA断片(0.76kb)を約0.2  $\mu$ g 回収した。

【0053】次に上記で得られたpAGE107 のHindIII-EcoRI 断片(約5.6kb)0.1  $\mu$ g と、pSV2-dhfr のBgl II-Hind III 断片(約0.76kb)0.1  $\mu$ g とを全量20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更にT4DNA リガーゼ350単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。このようにして得られた組換えプラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図10に示したプラスミドpSE1d1を得た。

【0054】(8) pSE1d2の構築  
pSE1d1のHindIII 切断部位が除去されたプラスミドpSE1d2を以下のように構築した。

【0055】(7)で得られたpSE1d1の2  $\mu$ g を100  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に

10単位のエコRI を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼI 緩衝液に溶解し、5単位の大腸菌DNA ポリメラーゼI クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、HindIII 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更にT4DNA リガーゼ350単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。このようにして得られた組換えプラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図11に示したプラスミドpSE1d2を得た。

【0056】(9) pIg1SE1d2 の構築  
pAGE503 にdhfr遺伝子が導入されたプラスミドpIg1SE1d2 を以下のように構築した。

【0057】(6)で得られたpAGE503 の2  $\mu$ g を100  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のエコRI を加えて37℃4時間反応させた。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼI 緩衝液に溶解し、5単位の大腸菌DNA ポリメラーゼI クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、EcoRI 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、30  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のMlu Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、EcoRI とMlu Iで切断したKM50免疫グロブリンH鎖プロモーターおよびエンハンサーを含むpAGE503 のDNA断片(約5.4kb)を約1  $\mu$ g 回収した。

【0058】次に(8)で得られたpSE1d2の2  $\mu$ g を100  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のエコRI を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼI 緩衝液に溶解し、5単位の大腸菌DNA ポリメラーゼI クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、EcoRI 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、30  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のエコRI を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、EcoRI とMlu Iで切断したdhfr遺伝子を含むpSE1d2のDNA 断片(約3.8kb)を約1  $\mu$ g 回収した。

【0059】次に上記で得られたpAGE503 のEcoRI-Mlu

I 断片 (約5.4kb) 1  $\mu$ g と、pSE1d2のXho I-Mlu I III 断片 (約3.8kb) 1  $\mu$ g を全量20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更にT4DNA リガーゼ350 単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。このようにして得られた組換えプラスミドDNA を用いて大腸菌HB 101 株を形質転換し、図12に示したプラスミドpIg1SE1d 2 を得た。

#### 【0060】(10) pIg1SE1d3 の構築

pIg1SE1d2 のApa I 切断部位が除去されたプラスミドpIg1SE1d3 を以下のように構築した。

【0061】(9) で得られたpIg1SE1d2 の2  $\mu$ g を10 0  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5)および6mM 塩化マグネシウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のアパ I を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼ I 緩衝液に溶解し、5 単位の大腸菌DNA ポリメラーゼ I クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、アパ I 消化によって生じた3' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350 単位

#### 【0062】(11) pIg1SE1d4 の構築

pIg1SE1d3 のHindIII 切断部位とEcoR I 切断部位の間にクローニングサイトを設けるために、配列番号2で示した合成DNAを挿入したプラスミドであるpIg1SE1d4 を以下のように構築した。

【0063】(10) で得られたpIg1SE1d3 の2  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5)、6mM 塩化マグネシウムおよび50mM塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のアパ I とEcoR I を加えて37℃で4時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、HindIII とEcoR I で切断したKM50細胞の免疫グロブリンH鎖プロモーター、エンハンサー、ApR 遺伝子、G4 18耐性遺伝子およびdhfr遺伝子を含むpIg1SE1d3 のDNA 断片 (約9.2kb) を約1  $\mu$ g 回収した。

【0064】次に上記で得られたpIg1SE1d3 のHindIII-EcoR I 断片 (約9.2kb) 0.1  $\mu$ g と、合成DNA (配列番号2) の10ngを全量20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更にT4DNA リガーゼ350 単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。このようにして得られた組換えプラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図14に示したプラスミドpIg1SE1d4 を得た。

【0065】3. モロニー Maus 白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート(long terminal repeat )

(以下、MoLTR と略記する) の調製

MoLTR はプロモーターおよびエンハンサー活性を有する

ことが知られている [桑名ら, バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) 149, 960 (1987) ]。そこで、MoLTR をカセットベクターのプロモーターおよびエンハンサーとして用いるために、MoLTRを有するプラスミドpPMOL3を以下に示す方法により調製した。

【0066】特開平1-63394 記載のpPMOL1の3  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5), 7mM塩化マグネシウムおよび6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液に加え、更に10単位のアパ I を加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼ I 緩衝液に溶解し、5 単位の大腸菌DNA ポリメラーゼ I クレノー断片を加え、16℃で2時間反応させ、アパ I 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノールで抽出することにより止め、クロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、DNA 断片を2  $\mu$ g 回収した。このDNA 断片と合成DNA リンカーXho I (宝酒造社製) の0.01  $\mu$ g を、T4リガーゼ緩衝液20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ175 単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応物を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図15に示したプラスミドpPMOL2を得た。次に、pPMOL2の3  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリス-塩酸(pH7.5), 7mM 塩化マグネシウム, 10mM塩化ナトリウムおよび6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液に加え、更に10単位のアパ I を加えて37℃4時間反応させた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、DNA 断片を2  $\mu$ g回収した。このDNA 断片と合成DNA リンカーEcoR I (宝酒造社製) の0.01  $\mu$ g を、T4リガーゼ緩衝液20  $\mu$ l に溶解し、T4DNA リガーゼ175 単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応物を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図16に示したプラスミドpPMOL3を得た。

【0067】4. ヒト免疫グロブリンIgG1のH鎖定常領域(C $\gamma$ 1) cDNAおよびL鎖定常領域(C $\kappa$ ) cDNAのクローニング

(1) キメラ抗体産生細胞SP2-PC Chimera-1からのmRNAの取得

インビトロジェン社製のmRNA抽出キットであるFast Track (商品番号K1593-02) を用いて、抗フォスホリルコリン活性を有するキメラ抗体産生細胞でフェデレーション・オブ・ヨーロッパ・バイオケミカル・ソサイエティーズ(FEBS letter) 244, 301-306 (1989) に記載されているキメラ抗体産生細胞SP2-PC Chimera-1の1 $\times$ 10<sup>8</sup> 細胞より、mRNAを6.2  $\mu$ g 取得した。

【0068】(2) SP2-PC Chimera-1 cDNA ライブラリーの作製とヒト免疫グロブリンH鎖定常領域(C $\gamma$ 1) cDNAおよびL鎖定常領域(C $\kappa$ ) cDNAのクローニング

(1) で得られたmRNAの2  $\mu$ g から、ファルマシア社製のcDNA Synthesis Kit (商品番号27-9260-01) を用い

て、EcoRI アダプターを付与した後、カイナーションを行った。得られたcDNA溶液をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、4  $\mu$ g のcDNAを回収した。このcDNAを20  $\mu$ l の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、約1.8kb と約1.0kb のDNA断片をそれぞれ約0.3  $\mu$ g 回収した。

【0069】次に、ベクターpUC18 の5  $\mu$ g を100mM トリス塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液100  $\mu$ l に加え、更に50単位のEcoRI を加え、37°Cで4時間反応させ、pUC18 のDNA 中のEcoRI 部位で切断した。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、EcoRI で切断したpUC18 のDNA 断片を約3  $\mu$ g 回収した。

【0070】次に上記で得られたpUC18 のEcoRI 断片(約2.7kb)0.1  $\mu$ g と、SP2-PC Chimera-1細胞より調製した1.8kb および1.0kb のcDNA断片各0.1  $\mu$ g を全量20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350単位のT4DNA リガーゼを加え、4°Cで24時間反応させた。このようにして得られた組換え体プラスミドDNA を用いて大腸菌LE392 株を形質転換した。得られた約3000個のコロニーをニトロセルロースフィルター上に固定した。亀山らによって単離されたヒト免疫グロブリン定常領域の染色体遺伝子(IgG1のH鎖の定常領域であるC $\gamma$ 1 と、L鎖の定常領域であるC $\kappa$ ) [亀山ら、FEBS letter 244, 301(1989)] を<sup>32</sup>Pで標識したプローブに65°Cで強く会合した菌株のうちC $\gamma$ 1 と会合するもの1個(pPCVhCGI1)、C $\kappa$ と会合するもの1個(pPCVhCHK1)をそれぞれ得た。

【0071】(3) ヒトIg $\kappa$  鎖定常領域へのEcoRV 部位の導入

プロメガ社製のキット(カタログ番号Q6210)を用いた部位特異的変異導入法によりヒトIg $\kappa$  鎖定常領域5'末端近傍領域にEcoRV 部位を導入した。プラスミドpPCVhCHK1 の2  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリス塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoRI と10単位のKpn I を加えて37°Cで4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、Kpn I とEcoRI で切断したヒト免疫グロブリンL鎖定常領域遺伝子を含むpPCVhCHK1 のDNA 断片(約0.8kb)を約0.2  $\mu$ g 回収した。

【0072】次にpSELECT1(プロメガ社製のキット:カタログ番号Q6210)の2  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリス塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび50mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoRI とKpn I を加えて37°Cで4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、EcoRI とKpn I とで切断したpSELECT1のDNA 断片(約5.7kb)を約1  $\mu$ g 回収した。

【0073】次に上記で得られたpPCVhCHK1 のEcoRI-Kpn I 断片(約0.8kb)0.1  $\mu$ g と、pSELECT1のEcoRI-Kpn

I断片(約5.7kb)0.1  $\mu$ g を全量20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350 単位のT4DNA リガーゼを加えて4°Cで24時間反応を行った。このようにして得られた組換え体プラスミドDNA を用いて大腸菌JM109 株を形質転換し、図17に示したプラスミドpChCKA7 を得た。

【0074】次にpChCKA7 を用いて、配列番号3の合成DNA を変異導入プライマーとして使用して、ヒト免疫グロブリンL鎖定常領域のN末端から12ベース目より14ベース目までのACC 配列をGAT に変換することにより、その部位にEcoRV 部位を導入したプラスミドpChCKB1 を構築した(図18)。次に、pChCKB1 のEcoRV 部位をHindIII 切断部位に変換するために、以下の操作を行った。

【0075】プラスミドpChCKB1 の2  $\mu$ g を10  $\mu$ l の100mM トリス塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoRI を加えて37°Cで4時間反応させた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、全量40  $\mu$ l のDNA ポリメラーゼI 緩衝液に溶解し、5 単位のDNA ポリメラーゼI クレノー断片を加え、37°Cで30分間反応させ、EcoRI 消化によって生じた5' 突出末端を平滑末端に変えた。該反応物を該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、更に0.1  $\mu$ g のHindIII リンカー(宝酒造社製)を加えて20  $\mu$ l のT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350 単位のT4リガーゼを加えて4°Cで24時間反応を行った。このようにして得られた組換え体プラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図19に示したプラスミドpChCKC1 を得た。

【0076】5. カセットベクターの構築

(1) ヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターを構築するために用いるカセットベクターの構築

2の(11)で得たpIg1SEId4 の2  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリス塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoRV とApa I を加えて37°Cで4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、EcoRV とApa I で切断した9.2kb のpIg1SEId4 のDNA 断片(約9.2kb)を約1.5  $\mu$ g 回収した。

【0077】次に4の(2)で得たpPCVhCGI1の2  $\mu$ g を30  $\mu$ l の10mM トリス塩酸(pH7.5) および6mM 塩化マグネシウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のApa I と10単位のSma I を加えて37°Cで1時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、Apa I とSma I で切断したヒト免疫グロブリンH鎖定常領域遺伝子を含むpPCVhCGI1のDNA 断片(約1kb)を約0.2  $\mu$ g 回収した。

【0078】次に上記で得られたpIg1SEId4 のEcoRV-Apa I 断片(約9.2kb)0.1  $\mu$ g と、pPCVhCGI1のApa I-Sma I 断片(約1kb)0.1  $\mu$ g を全量20  $\mu$ l のT4リガー



ゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350 単位のT4DNA リガーゼを加えて4℃で24時間反応させた。このようにして得られた組換え体プラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図20に示すヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターを構築するために用いるカセットベクターであるプラスミドpChiIgHB2 を得た。

【0079】(2) ヒト型キメラ抗体L鎖発現ベクターを構築するために用いるカセットベクターの構築

2の(11)で得られたpIg1SEId4 の2μg を30μl の10mM トリス塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10 単位のEcoRV と10単位のHindIII を加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、EcoRV とHindIII で切断したpIg1SEId4 のDNA 断片(約9.2kb)を約1.5 μg 回収した。

【0080】次に4の(3)で得られたpchCKC1 の2μg を30μl の10mM トリス塩酸(pH7.5) , 6mM 塩化マグネシウムおよび100mM 塩化ナトリウムからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoRV と10単位のHindIII を加えて37℃で1時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、EcoRV とHindIII で切断したヒト免疫グロブリンL鎖定常領域遺伝子を含むpPCVLhCK1 のDNA 断片(約0.6kb)を約0.2 μg 回収した。

【0081】次に上記で得られたpIg1SEId4 のEcoRV-Hind III 断片(約9.2kb)0.1 μg と、pchCKC1 のEcoRV-Hind III 断片(約0.6kb)0.1 μg を全量20μl のT4DNA リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350 単位のT4DNA リガーゼを加えて4℃で24時間反応を行った。このようにして得られた組換え体プラスミドDNA を用いて大腸菌HB101 株を形質転換し、図21に示したヒト型キメラ抗体L鎖発現ベクターを構築するために用いるカセットベクターであるプラスミドpChiIgLA1 を得た。

【0082】実施例2 抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体

1. マウス抗GD<sub>3</sub> モノクローナル抗体KM-641産生ハイブリドーマ細胞からのmRNAの取得

インビトロジェン社製のmRNA抽出キットであるFast Track (商品番号K1593-02)を用いて、参考例1で得られるマウス抗GD<sub>3</sub> モノクローナル抗体KM-641産生ハイブリドーマ細胞の1×10<sup>8</sup> 細胞より、mRNAを34μg 取得した。

【0083】2. KM-641のH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

1で取得したmRNAの3μg から、ストラタジーン社製のcDNA合成キットであるZAP-cDNA Synthesis Kit (商品番号sc200400)を用い、5' 末端にEcoRI アダプター、3' 末端にXho I アダプターを有するcDNAをそれぞれ合成した。このcDNA約6μg を10μl の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、H鎖に対応する約1.8kb のcDNA断片とL鎖に対応する約1.0kb のcDNA断片をそれぞれ約0.1 μg 回収した。次に、約1.8kb のcDNA断片0.1 μg および約1.0kb のcDNA断片0.1 μg と、ベ

クターとして用いるUni-ZAP XR (ストラタジーン社製、Lambda ZAPIIベクターをEcoRI とXho I で切断後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase で処理したもの) 1μg をT4リガーゼ緩衝液11.5μl に溶解し、T4DNA リガーゼ175 単位を加えて、12℃にて1晩インキュベートし、さらに室温にて2時間インキュベートした。この反応液のうち4μl を常法〔マニアティス(Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、1989年、p2.95〕に従い、ギガパックゴールド (ストラタジーン社製)を使用し、ラムダファージにパッケージングし、これを常法〔Maniatisら編集、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、1989年、p2.95-107〕に従って、大腸菌株PLK-Fに感染させて、H鎖のcDNAライブラリーおよびL鎖のcDNAライブラリーとしてそれぞれ約1万個のファージクローンを取得した。次に常法〔マニアティス(Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、1989年、p2.112〕に従い、ファージをニトロセルロースフィルター上に固定した。

【0084】3. モノクローナル抗体KM-641のH鎖およびL鎖cDNAのクローニング

2で作製したH鎖のcDNAライブラリーおよびL鎖のcDNAライブラリーより、常法〔マニアティス(Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、1989年、p2.108〕に従い、マウス免疫グロブリン定常領域の染色体遺伝子であるマウスCγ1 遺伝子を含む約6.8kb のEcoRI 断片〔Roederら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 474(1981)〕およびマウスCκ 遺伝子を含む約3kb のHindIII-BamHI 断片〔Sakanoら、Nature 280, 288(1979)を<sup>32</sup>Pで標識したプローブを用いて、プローブに65℃で強く会合したファージクローンをそれぞれ1個ずつ取得した。次に、ストラタジーン社製のcDNA合成キットであるZAP-cDNA Synthesis Kit (商品番号sc200400)を用いて、ファージクローンをプラスミドpBluescript に変換し、KM-641のH鎖のcDNAを含む組換えプラスミドpKM641HA3 およびKM-641L鎖cDNAを含む組換えプラスミドpKM641LA2 をそれぞれ取得した。pKM641HA3 およびpKM641LA2 をEcoRI とXho I を用いて切断したところ、それぞれ約1.6kb および約0.9kb のcDNA断片が挿入されていた(図22)。

【0085】4. KM-641のH鎖cDNA(pKM641HA3) およびKM-641のL鎖cDNA(pKM641LA2) の免疫グロブリン可変領域の塩基配列

3で得られたpKM641HA3 およびpKM641LA2 の免疫グロブリン可変領域の塩基配列をSequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit(United States Biochemical Corporation社製)を用いてダイデオキシ法〔マニアティス(Maniatis)ら編集、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、1989年、p13.42〕により決定した。その結果得られたH鎖可変領域の塩基配列をを配列番号4に、L



鎖可変領域の塩基配列を配列番号5にそれぞれ示した。pKM641LA2は、5'端付近に開始コドンATGと推定されるメチオニンが存在し、リーダー配列を含む完全長のcDNAであった。pKM641HA3は、5'端付近に開始コドンと推定されるメチオニンが存在せず、リーダー配列が一部欠損していた。

【0086】5. KM-641キメラH鎖発現ベクターの構築  
プラスミドpKM641HA3の可変領域遺伝子の5'末端付近のAlu I部位および可変領域遺伝子の3'末端付近のSty I部位で切断して得られるH鎖可変領域遺伝子を配列番号6および7に示す合成DNAを用いて実施例1で得られたヒト型キメラ抗体H鎖の構築のために用いるカセットベクターと連結させることにより、ヒト型キメラ抗体H鎖発現ベクターを構築した(図23)。

【0087】まず、pKM641HA3の免疫グロブリンH鎖可変領域の3'末端から3'末端付近にあるSty I切断部位までの塩基配列と、pAGE28の免疫グロブリンH鎖定常領域の5'末端から5'末端付近にあるApa I切断部位までの塩基配列とからなり、Sty I切断部位とApa I切断部位を両端に有する配列番号7に示したDNA(図23参照)をDNA合成機で合成した。次に、この合成DNAを以下に示す方法で、プラスミドpKM641HA3に導入した。

【0088】pKM641HA3の3μgを30μlの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoR Iと10単位のSty Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、0.41kbのDNA断片を約0.3μg回収した。次に、pAGE28〔水上ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem) 101, 1307-1310(1987)〕の3μgを30μlの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、7mM塩化マグネシウムおよび6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoR Iと10単位のApa Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、2.45kbのDNA断片を約2μg回収した。次に、上記で得られたpKM641HA3のEcoR I-Sty I断片(約0.41kb)0.1μgおよびpAGE28のEcoR I-Apa I断片(約2.45kb)0.1μgおよび配列番号7に示す合成DNAの0.3μgを全量20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350単位のT4リガーゼを加え4℃で24時間反応させた。このようにして得られた組換え体プラスミドDNAを用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図24に示したプラスミドpKM641HE1を得た。

【0089】pKM641HE1はリーダー配列が欠損しているため、それを補填するために配列番号6に示した合成DNAを用いて以下の操作を行った。pKM641HE1の3μgを30μlの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、7mM塩化マグネシウムおよび6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoR Iと10単位のApa Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル

電気泳動にて分画し、約0.42kbのDNA断片を約0.4μg回収した。pKM641HE1のEcoR I-Apa I断片(約0.42kb)0.4μgを30μlの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、7mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液に加え、更に10単位のAlu Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、約0.4kbのDNA断片を約0.3μg回収した。

【0090】次に、上記で得られたpKM641HE1のAlu I-Apa I断片(約0.4kb)0.1μgおよびpAGE28のEcoR I-Apa I断片(約2.45kb)0.1μgおよび配列番号6に示す合成DNAの0.3μgを全量20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350単位のT4リガーゼを加え4℃で24時間反応させた。このようにして得られた組換え体プラスミドDNAを用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図25に示したプラスミドpKM641HF1を得た。

【0091】次に、pKM641HF1の免疫グロブリンH鎖可変領域をカセットベクターpChiIghB2に導入するために以下の操作を行った。pKM641HF1の3μgを30μlの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、7mM塩化マグネシウムおよび6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoR Iと10単位のApa Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、0.44kbのDNA断片を約0.5μg回収した。次に、pChiIghB2の3μgを30μlの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、7mM塩化マグネシウムおよび6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoR Iと10単位のApa Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させ、約3μgのDNAを回収した。次に、上記で得られたpKM641HF1のEcoR I-Apa I断片(約0.44kb)0.1μgおよびpChiIghB2のEcoR I-Apa I断片(約10.1kb)0.1μgを全量20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350単位のT4リガーゼを加え4℃で24時間反応させた。このようにして得られた組換え体プラスミドDNAを用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図26に示したプラスミドpChi641HA1を得た。

【0092】次に、以下に示す方法で、pChi641HA1のKM50由来免疫グロブリンH鎖プロモーターおよびエンハンサー領域をMoLTRに変換した。pChi641HA1の3μgを30μlの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoR Iと10単位のXho Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約8.8kbのDNA断片を約0.2μg回収した。実施例1の2で得られたpPMOL3の3μgを30μlの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoR Iと10単位のXho Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電

気泳動にて分画し、MoLTRを含む0.63kbのDNA断片を約0.3  $\mu$ g回収した。次に、pChi641HA1のEcoRI-Xho I断片0.1  $\mu$ gおよびpPMOL3のEcoRI-Xho I断片0.1  $\mu$ gをT4リガーゼ緩衝液20  $\mu$ lに溶解し、T4DNA リガーゼ175単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応物を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図27に示したKM-641キメラH鎖発現ベクターであるプラスミドpChi641HAM1を得た。

【0093】6. KM-641キメラL鎖発現ベクターの構築  
プラスミドpKM641LA2の可変領域遺伝子の5'末端のEcoRI部位および可変領域遺伝子の3'末端付近のHindIII部位で切断して得られるL鎖可変領域遺伝子を配列番号8に示した合成DNAを用いてキメラL鎖用カセットベクターと連結させることによりL鎖用発現ベクターを構築した(図28)。

【0094】まず、pKM641LA2の免疫グロブリンのL鎖可変領域の3'末端から3'末端付近にあるHindIII切断部位までの塩基配列と、pChiIgLA1の5'末端から5'末端付近にあるEcoRV切断部位までの塩基配列とからなり、HindIII切断部位とEcoRV切断部位を両端に有する配列番号8で示したDNA(図29参照)をDNA合成機を用いて合成した。次に、この合成DNAを以下に示す方法でpKM641LA2に導入した。

【0095】pKM641LA2の3  $\mu$ gを30  $\mu$ lの10mMトリス-塩酸(pH7.5)、7mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび6mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoRIと10単位のHindIIIを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、0.35kbのDNA断片を約0.3  $\mu$ g回収した。次に、pChiIgLA1の3  $\mu$ gを30  $\mu$ lの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる緩衝液に加え、更に10単位のEcoRIと10単位のEcoRVを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱させた後、約3  $\mu$ gのDNAを回収し、10mMトリス-塩酸(pH7.5)および1mM EDTAからなるTE溶液10  $\mu$ lに溶解した。次に、上記で得られたpKM641LA2のEcoRI-Hind III断片(約0.35kb)0.1  $\mu$ gおよびpChiIgLA1のEcoRI-EcoRV断片(約9.7kb)0.1  $\mu$ gおよび配列番号8に示す合成DNAの0.3  $\mu$ gを全量20  $\mu$ lのT4リガーゼ緩衝液に溶解し、この溶液に更に350単位のT4リガーゼを加え4℃で24時間反応させた。このようにして得られた組換え体プラスミドDNAを用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図29に示したプラスミドpChi641LG11を得た。

【0096】次に、以下に示す方法で、pChi641LG11のKM50由来の免疫グロブリンH鎖プロモーターおよびエンハンサー領域をMoLTRに変換した。pChi641LG11の3  $\mu$ gを30  $\mu$ lの50mMトリス-塩酸(pH7.5)、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウムおよび1mM DTTからなる

緩衝液に加え、更に10単位のEcoRIと10単位のXho Iを加えて37℃で4時間反応させた。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約8.3kbのDNA断片を約0.2  $\mu$ g回収した。次に、pChi641LG11のEcoRI-Xho I断片0.1  $\mu$ gおよびpPMOL3のEcoRI-Xho I断片0.1  $\mu$ gをT4リガーゼ緩衝液20  $\mu$ lに溶解し、T4DNA リガーゼ175単位を加えて、1日間、4℃にてインキュベートした。該反応物を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、図30に示したKM-641キメラL鎖発現ベクターであるプラスミドpChi641LGM11を得た。

【0097】7. 抗GD<sub>3</sub>キメラ抗体のSP2/0細胞における発現

SP2/0細胞へのプラスミドの導入は、Miyajiらの方法に従い、エレクトロポレーション法[サイトテクノロジー(Cytotechnology), 3, 133-140(1990)]にて行った。

【0098】 $2 \times 10^6$ 細胞あたりpChi641LG11およびpChi641HA1を各2  $\mu$ g同時に、または、pChi641LGM11およびpChi641HAM1を各2  $\mu$ g同時に導入後、40mlのRPMI1640-FCS(10) [FCSを10%、7.5% NaHCO<sub>3</sub>を1/40量、200mM L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(GIBCO社製、5000units/ml ペニシリンおよび5000  $\mu$ g/mlストレプトマイシン含有)を0.5%含むRPMI1640培地(日水製薬社製)]に懸濁し、96穴マイクロタイタープレートに200  $\mu$ lずつ分注した。CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃、24時間培養した後、G418(ギブコ社製)を0.5mg/mlになるように添加して1~2週間培養した。形質転換株のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養液を回収し、抗GD<sub>3</sub>キメラ抗体活性を以下に示すELISA法にて測定した。

【0099】酵素免疫測定法(ELISA法)

2ngのGD<sub>3</sub>(ヤトロニ社製)またはその他のガングリオシドを5ngのフォスファチジルコリン(シグマ社製)と2.5ngのコレステロール(シグマ社製)とを含む2  $\mu$ lのエタノール溶液に溶解した。この溶液20  $\mu$ lまたはこの溶液の希釈液20  $\mu$ lを96ウェルマイクロタイタープレート(グライナー社製)の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSAを含むPBSでブロッキングを行った。ここに形質転換株の培養上清または精製したマウスモノクローナル抗体または精製したキメラ抗体を50~100  $\mu$ l加え、一晚、4℃で反応させた。反応後、各ウェルをPBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識プロテインA(フナコシ社製)を50~100  $\mu$ l加え、1~2時間室温で反応させた。PBSで洗浄後、ABTS基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウムの550mgを0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素1  $\mu$ l/mlを加えた溶液]を50~100  $\mu$ lを加えて発色させ、OD<sub>492</sub>を測定した。

【0100】得られたクローンの中で、ELISA法で最も高い活性を示したクローンの培養液中の抗GD<sub>3</sub>キメラ抗

体量は約0.1  $\mu\text{g/ml}$ であった。上記抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体活性を示したクローンについて、G418を0.5mg/ml、メソトレキセート（以下MTXと略記する）を50nM含むRPMI1640-FCS(10)培地に1～2×10<sup>5</sup>細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレートに2ml分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで37℃、2～3週間培養して、50nM MTX耐性クローンを誘導した。コンフルエントになった時点で培養液中の抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体活性をELISA法にて測定した。得られたクローンの中で、ELISA法で最も高い活性を示した50nM MTX耐性クローンの抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体量は約0.3  $\mu\text{g/ml}$ であった。

【0101】上記50nM MTX耐性クローンについて、G418を0.5mg/mlおよびMTXを200nM含むRPMI1640-FCS(10)培地に1～2×10<sup>5</sup>細胞/mlになるように懸濁し、24ウェルプレートに2ml分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで37℃、2～3週間培養して、200nM MTX耐性クローンを誘導した。コンフルエントになった時点で、培養液中の抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体活性をELISA法にて測定した。得られたクローンの中で、ELISA法で最も高い活性を示した200nM MTX耐性クローンの抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体量は約2  $\mu\text{g/ml}$ であった。この200nM MTX耐性クローンを形質転換株KM-871と命名した。

【0102】上記形質転換株KM-871が抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体タンパク質を発現することをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により以下のようにして確認した。形質転換株KM-871を、G418を0.5mg/mlおよびMTXを200nM含むGIT培地（日本製薬社製）に1～2×10<sup>5</sup>細胞/mlになるように懸濁し、175cm<sup>2</sup>フラスコ（グライナー社製）に100ml分注した。CO<sub>2</sub> インキュベーターで37℃、3～5日間培養し、コンフルエントになった時点で\*

\*培養液を回収した。該培養液約900mlを50%硫酸で塩析後、アフィゲルプロテインA MAPS-IIキット（バイオラッド社製）を用いて、精製された抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体KM-871を約100  $\mu\text{g}$ 取得した。精製されたGD<sub>3</sub> キメラ抗体KM-871の約5  $\mu\text{g}$ を、公知の方法〔レムリー(Laemmli)、ネイチャー(Nature) 227,680(1970)〕に従って電気泳動し、抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体KM-871の分子量を調べた。その結果を図31に示した。図31に示したように、還元条件下ではキメラH鎖の分子量は約50キログルトン、キメラL鎖の分子量は約25キログルトンであり、正しい分子量のH鎖およびL鎖の発現が確認された。また、非還元条件下ではキメラ抗体の分子量は約150キログルトンであり、2本のH鎖および2本のL鎖よりなる正しい大きさの抗体の発現が確認された。

【0103】8. 抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体KM-871の反応特異性  
 ガングリオシドGM<sub>1</sub>, N-アセチルGM<sub>2</sub>（ベーリンガー・マンハイム社製）、N-グリコリルGM<sub>2</sub>, N-アセチルGM<sub>3</sub>, N-グリコリルGM<sub>3</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>（ヤトロロン社製）、GD<sub>2</sub>, GD<sub>3</sub>（ヤトロロン社製）、GT<sub>1b</sub>（フナコシ社製）およびGQ<sub>1b</sub>（ヤトロロン社製）に対する抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体の反応性をELISA法で測定した。GM<sub>1</sub>とGD<sub>1a</sub>はウシ脳より、N-グリコリルGM<sub>2</sub>とN-グリコリルGM<sub>3</sub>はマウス肝臓より、N-アセチルGM<sub>3</sub>はイヌ赤血球より、GD<sub>2</sub>は培養細胞株IMR32(ATCC CCL127)によりそれぞれ公知の方法〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 263,10915(1988)〕に準じて精製した。その結果を第1表に示す。

【0104】

【表1】

第1表

ガングリオシド

抗体の結合活性 (OD<sub>415</sub>)

	抗GD <sub>3</sub> キメラ抗体 (0.3 μg/ml)	マウス抗GD <sub>3</sub> 抗体 (0.4 μg/ml)
N-アセチルGM <sub>1</sub>	0.007	0.006
N-グリコシルGM <sub>1</sub>	0	0
N-アセチルGM <sub>2</sub>	0	0
N-グリコシルGM <sub>2</sub>	0	0
GM <sub>1</sub>	0	0
GD <sub>2</sub>	0	0
GD <sub>3</sub>	0.717	1.33
GD <sub>1a</sub>	0	0
GD <sub>1b</sub>	0	0
GT <sub>1a</sub>	0	0
GQ <sub>1a</sub>	0	0.16

【0105】第1表に示したように、抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体KM-871およびマウス抗GD<sub>3</sub> 抗体KM-641はGD<sub>3</sub> のみに反応し、他のガングリオシドには反応せず、キメラ化により反応特異性は変化しなかった。

【0106】9. 蛍光抗体法による抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体KM-871の腫瘍細胞との反応性  
GD<sub>3</sub> を発現しているヒト悪性黒色腫培養細胞株SK-MEL-28 (ATCC HTB72) およびG361 (ATCC CRL1424) のそれぞれ1×10<sup>6</sup> 個をマイクロチューブ (トレフ社製) にとりPBSで遠心分離 (1200rpm、5分) して細胞を洗浄後、KM-871を50 μl (10 μg/ml) 加えて攪拌し、4℃、30分間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離 (1200rpm、5分) して洗浄した後、フルオレッセインイソシアシアネートで蛍光標識したプロテインA (ベーリンガーマンハイム山之内社製、20倍希釈) 20 μl を加えて攪拌後、4℃、30分間反応させた。反応後、PBSで3回遠心分離 (1200rpm、5分) して洗浄した後、さらにPBSに懸濁し、フローサイトメーターFCS-1 (日本分光社製) で解析を行った。

【0107】対照としてKM-871無添加で以下上記と同様の操作により解析を行った。その結果を図32に

示す。KM-871の蛍光強度は、対照のそれと比較するとピークの位置が右側 (蛍光強度強) に移動しており、KM-871はヒト悪性黒色腫培養細胞株SK-MEL-28およびG361細胞表面のGD<sub>3</sub> に直接反応していることが示された。

【0108】10. 抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体KM-871のin vitro 抗腫瘍効果：補体依存的細胞障害活性 (Complement Dependent Cytotoxicity: CDC)

(a) 標的細胞の調製

10% FCS添加RPMI-1640 培地に浮遊させた標的細胞SK-MEL-28およびG361をそれぞれ1×10<sup>7</sup> 個/mlに調整し、Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>を100 μCi/1×10<sup>7</sup> 個になるように加え、37℃で1時間反応後、培地で3回洗浄した。次いで4℃、30分間培地中に放置し、自然解離させ、遠心分離 (1200rpm、5分) 後、培地を加えて4×10<sup>6</sup> 個/mlに調整した。

【0109】(b) 補体の吸収

3人の健常人の血清を混合し、ヒト抗体源として用いた。

【0110】(c) CDC活性の測定

96穴U字底プレートに抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体KM-871および抗GD<sub>3</sub> マウス抗体KM-641を各最終濃度

30

40

50

0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲でそれぞれ加え、各々に標的細胞  $2 \times 10^5$  個/穴を添加した。室温で1時間反応させ、遠心分離 (1200rpm、5分) 後、上清を除去し、(b) で得られたヒト血清 (最終濃度 15% V/V) 150  $\mu\text{l}$  を添加し、37℃、1時間反応させた。遠心分離 (1200rpm、5分) 後、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離 $^{51}\text{Cr}$ 量は、標的細胞に抗体、補体溶液の代わりに培地のみを添加し、上記\*

検体上清中の $^{51}\text{Cr}$ 量-自然解離 $^{51}\text{Cr}$ 量

$$\text{CDC活性(\%)} = \frac{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100$$

【0112】その結果を図33に示す。SK-MEL-28およびG361に対してキメラ抗体KM-871はマウス抗体KM-641に比べ強いCDC活性を示した。この結果は、キメラ抗体KM-871の方がマウス抗体KM-641よりも腫瘍の治療等において有用であることを示している。

【0113】11. 抗GD<sub>3</sub>キメラ抗体KM-871の in vitro 抗腫瘍効果：抗体依存的細胞媒介障害活性 (Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity: ADCC)

(a) 標的細胞の調製

10の(a)と同様にして標的細胞G361を調製した。

【0114】(b) エフェクター細胞の調製

ヒト静脈血50mlを採血し、ヘパリンナトリウム (武田薬品、1000単位/ml) 0.5mlを加え穏やかに混ぜる。これをPolymorphprep (Nycomed Pharma AS 社製) を用いて遠心分離 (1500 ~ 1800 g、15分) してリンパ球層および多型核白血球層を分離し、RPMI-1640 培地で3回遠心分離 (1500 ~ 1800 g、15分) して洗浄後、10% FCS添加RPMI-1640 培地に懸濁 ( $5 \times 10^6$  細胞/ml) し、※

検体上清中の $^{51}\text{Cr}$ 量-自然解離 $^{51}\text{Cr}$ 量

$$\text{ADCC活性(\%)} = \frac{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}}{\text{全解離}^{51}\text{Cr量} - \text{自然解離}^{51}\text{Cr量}} \times 100$$

【0117】対照として、抗体の代わりに培地を添加し、上記と同様に行い、対照の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定しADCC活性を求めた。その結果を図34に示す。

【0118】エフェクター細胞としてリンパ球および多型核白血球のいずれを用いても、G361に対するADCC活性は、キメラ抗体KM-871の方がマウス抗体KM-641に比べて強かった。この結果は、キメラ抗体KM-871の方がマウス抗体KM-641よりも腫瘍の治療等において有用であることを示している。

【0119】12. 抗GD<sub>3</sub>キメラ抗体KM-871の in vitro 抗腫瘍効果：移植腫瘍に対する治療効果

ヒト悪性黒色腫培養細胞株G361の  $1 \times 10^7$  個を1群5~7匹のBalb/c nu/nuマウス腹部皮内に移植した。

移植後、KM-871の100  $\mu\text{g}$  を腫瘍移植翌日から4★50

\*と同様に上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定することにより求めた。

全解離 $^{51}\text{Cr}$ 量は、補体溶液の代わりに5規定水酸化ナトリウムを添加し、上記と同様に行い、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定することにより求めた。CDC活性は、下式により求めた。

【0111】

【数1】

※リンパ球および多型核白血球をそれぞれエフェクター細胞とした。

【0115】(c) ADCC活性の測定

96穴U字底プレートに抗GD<sub>3</sub>キメラ抗体KM-871および抗GD<sub>3</sub>マウス抗体KM-641を50  $\mu\text{l}$  (各最終濃度10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 加え、各々に標的細胞  $2 \times 10^5$  個/穴 (100  $\mu\text{l}$ ) およびエフェクター細胞  $5 \times 10^5$  個/穴 (50  $\mu\text{l}$ ) を添加した (エフェクター細胞と標的細胞の比は50:1および100:1)。37℃、4時間反応させた後、遠心分離 (1200rpm、5分) し、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離 $^{51}\text{Cr}$ 量は、標的細胞に抗体、エフェクター細胞の代わりに培地のみを添加し、上記と同様に上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定することにより求めた。全解離 $^{51}\text{Cr}$ 量は、抗体、エフェクター細胞の代わりに5規定水酸化ナトリウムを添加し、上記と同様に行い、上清の $^{51}\text{Cr}$ 量を測定することにより求めた。ADCC活性は下式により求めた。

【0116】

【数2】

★回静脈内に投与した。また、対照群として、抗GD<sub>3</sub>マウス抗体KM-641および抗シアリルLe<sup>a</sup>モノクローナル抗体AMC-462 (ECACC86050801) の100  $\mu\text{g}$  をそれぞれ腫瘍移植当日より5回静脈内に投与した。移植腫瘍に対する治療効果を、下記式により算出した腫瘍体積により表した。

【0120】

【数3】

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 0.4 \times a \times b^2$$

a : 長径(mm)

b : 短径(mm)

【0121】その結果を図35に示した。図35に示したように、AMC-462を投与した対照群において

は、著しい腫瘍の増殖が認められたが、KM-871およびKM-641投与群は有意に腫瘍の増殖が抑制され、さらに、KM-871投与群においては、腫瘍移植後65日後において腫瘍の着生が完全に阻害され、強い腫瘍に対する治療効果が認められた。

#### 【0122】参考例1

##### (1) 抗原の調製

非還元末端にNeuAcα2→8NeuAcα2→3Gal糖鎖の結合したガングリオシドGD<sub>3</sub>（ヤマトン社製）5μg、ジパルミトイルフォスファチジルコリン（シグマ社製）0.5μmol、コレステロール（ナカライテスク社製）0.5μmol、ジパルミトイルフォスファチジリック酸（シグマ社製）0.05μmol およびリピッドA（フナコシ薬品社製）2.5μgをクロロホルム/メタノール（2/1）溶液30mlに溶解し、45℃に加温して溶媒除去し、均一な脂質薄膜を形成させた。さらに真空ポンプで1時間吸引して完全に溶媒を除き、0.5mlのPBSを加え45℃で攪拌し抗原溶液を得た。

##### 【0123】(2) 抗体産生細胞の調製

(1)で調製した抗原溶液0.5mlをマウスの尾静脈に1週に1回、計7回投与し免疫した。さらにガングリオシドGD<sub>3</sub>陽性細胞SK-MEL-28(ATCC HTB 72)(1×10<sup>7</sup>個)を1週に1回計3回腹腔内投与し免疫した。最終投与後の3日目にマウスよりそれぞれ脾細胞を調製して、細胞融合に供した。

##### 【0124】(3) マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株P3-U1を正常培地で培養し、細胞融合時に2×10<sup>7</sup>以上の細胞を得、細胞融合に親株として供した。

##### 【0125】(4) ハイブリドーマの作製

(2)と(3)で得られた脾細胞と骨髄腫細胞とを10:1の割合で用いて前述した方法で融合させ、HAT培地で37℃、14日間CO<sub>2</sub>5%下で培養した。融合細胞を選択し、HT培地に変えてさらに培養した後、ガングリオシドGD<sub>3</sub>に対する抗体価を測定して、活性なウェルを選び、さらに正常培地に変え、2回クローニングを繰り返して、酵素免疫測定法または、免疫組織学的判定法(ABC法)により、ガングリオシドGD<sub>3</sub>に特異的に反応するハイブリドーマを選択した。すなわち、ガング\*

存在位置: 261..267

AAAGTCAGAC AACTTTGTAG AGTAGGTTCT ATCAATCCTA CTGCAATCCA	50
ACATCACTGA GGACAAATGT TTATACTGAG GAACCTGGTC TTGTGTGATA	100
CGTACTTTCT GTGGGAAGCA GATACGCACT CTCATGTGGC TCCTGAATTT	150
CCCATCAGAC AATGATACAT CTTGAGTCCT AAAATTTAAG TACACCATCA	200
GTGTCAGCAC CTGGTGAGGA AATGCAAATC TCTCCTGGAT CCACCCAACC	250
TTGGGTTGAA AAGCCAAAGC TGGGCCTGGG TACTCACTGG TGTGCAGCC	299
ATG GAC AGG CTT ACT TCC TCA TTC CTA CTG CTG ATG GTC	338
Met Asp Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Met Val	
-15	-10
CCT GCA T GTGAGTACCA AAGCTTCCTA AGTGATGAAC	375

\* リオシドGD<sub>3</sub> {犬の赤血球よりノーレス (Nores) 等の方法 [ジャーナル・イミュノロジー(J. Immunol.) 139, 3171(1987)] に従って精製したもの} およびガングリオシドGD<sub>3</sub> (ヤマトン社製) それぞれ2ngを5ngのフォスファチジルコリン (シグマ社製) と2.5ngのコレステロール (シグマ社製) とを含む2mlのエタノール溶液に溶解した。このうち20μlを96穴マイクロタイタープレート (フローラボラトリーズ社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1%BSA-PBS溶液でブロッキングを行った。ハイブリドーマの培養上清をガングリオシドGD<sub>3</sub>を吸着させたプレートとガングリオシドGD<sub>3</sub>を吸着させたプレートに各50μlずつ分注し、18時間、4℃で反応させた。

【0126】以下公知の方法 [キャンサー・リサーチ (CancerRes.) 46, 4438(1986)] に従い反応を行い、ガングリオシドGD<sub>3</sub>に反応せず、ガングリオシドGD<sub>3</sub>に特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を選択した。該マウスモノクローナル抗体をマウスモノクローナル抗体KM-641とし、該抗体を生産するハイブリドーマをハイブリドーマKM-641とした。ハイブリドーマKM-641は平成2年9月27日付で工業技術院微生物工業技術研究所にFERM BP-3116として寄託してある。

【発明の効果】本発明により、マウス抗体可変領域のアミノ酸配列が全く変化しないヒト型キメラ抗体の簡便な製造方法およびガングリオシドGD<sub>3</sub>に対するヒト型キメラ抗体が提供される。

##### 【0127】

##### 【配列表】

【0128】配列番号: 1

配列の長さ: 818

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

ハイブリドーマ: KM50

配列の特徴

特徴を表す記号: TATA signal

39 Pro Ala  
-5  
TGTTCTATCC TCACCTGTTC AAACCTGACC TCCTCCCTT TGATTCTCC 425  
ACAG AT GTC CTG TCT CAG GTT ACT CTG AAA GAA TCT GGC 464  
Tyr Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly  
i 5  
CCT GGG ATA TTG CAG CCC TCC CAG ACC CTC AGT CTG ACT 503  
Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr  
10 15 20  
TGC TCT TTC TCT GGG TTT TCA CTG AGC ACT TAT GGT ATG 542  
Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Met  
25 30  
TGT GTG GGC TGG ATT CGT CAG TCT TCA GGG AAG GGT CTG 581  
Cys Val Gly Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Gly Leu  
35 40 45  
GAG TGG CTG GCA AAC GTT TGG TGG AGT GAT GCT AAG TAC 620  
Glu Trp Leu Ala Asn Val Trp Trp Ser Asp Ala Lys Tyr  
50 55 60  
TAC AAT CCA TCT CTG AAA AAC CGG CTC ACA ATC TCC AAG 659  
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys  
65 70  
GAC ACC TCC AAC AAC CAA GCA TTC CTC AAG ATC ACC AAT 698  
Asp Thr Ser Asn Asn Gln Ala Phe Leu Lys Ile Thr Asn  
75 80 85  
ATG GAC ACT GCA GAT ACT GCC ATA TAC TAC TGT GCT GGG 737  
Met Asp Thr Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Gly  
90 95  
AGA GGG GCT ACG GAG GGT ATA GTG AGC TTT GAT TAC TGG 776  
Arg Gly Ala Thr Glu Gly Ile Val Ser Phe Asp Tyr Trp  
100 105 110  
GGC CAC GGA GTC ATG GTC ACA GTC TCC TCA GGTAAG 812  
Gly His Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser  
105 110

【0129】配列番号： 2

※鎖の数： 二本鎖

配列の長さ： 46

トポロジー： 直鎖状

配列の型： 核酸

※配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

AGCTGAATTC GGGCCGATA TCAAGCTTGT CGACTCTAGA GGTACC 46

【0130】配列番号： 3

※鎖の数： 二本鎖

配列の長さ： 29

40 トポロジー： 直鎖状

配列の型： 核酸

※配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

GATGAAGACA GATATCGCAG CCACAGTTC 29

【0131】配列番号： 4

★起源

配列の長さ： 403

ハイブリドーマ： KM-641

配列の型： 核酸

配列の特徴

鎖の数： 二本鎖

特徴を表す記号： sig peptide

トポロジー： 直鎖状

存在位置： 14..43

配列の種類： cDNA to mRNA

★特徴を決定した方法： S

配列

50



41	AATTCGGCAC GAG CTT GTC CTT GTT TTC AAA GGT GTT CAG TGT GAA GTG	42	49
	Leu Val Leu Val Phe Lys Gly Val Gln Cys Glu Val		
	-10 -5 1		
	ACG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TTT GTG AAA CCT GGA GGG TCC CTG		97
	Thr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Phe Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu		
	5 10 15		
	AAA GTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC GCT TTC AGT CAT TAT GCC ATG		145
	Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr Ala Met		
	20 25 30		
	TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCG GCG AAG AGG CTG GAA TGG GTC GCA TAT		193
	Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr		
	35 40 45 50		
	ATT AGT AGT GGT GGT AGT GGC ACC TAC TAT TCA GAC AGT GTA AAG GGC		241
	Ile Ser Ser Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly		
	55 60 65		
	CGA TTC ACC ATT TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA		289
	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln		
	70 75 80		
	ATG CGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC TCG GCC ATG TAT TTC TGT ACA AGA		337
	Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Thr Arg		
	85 90 95		
	GTT AAA CTG GGA ACC TAC TAC TTT GAC TCC TGG GGC CAA GGC ACC ACT		385
	Val Lys Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
	100 105 110		
	CTC ACT GTC TCC TCA GCT		403
	Leu Thr Val Ser Ser Ala		
	115 120		

【0132】配列番号： 5

配列の長さ： 408

配列の型： 核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA to mRNA

\* 起源

ハイブリドーマ： KM-641

30 配列の特徴

特徴を表す記号： sig peptide

存在位置： 25..84

\* 特徴を決定した方法： S

配列

AATTCGGCAC GAGTCAGCCT GGAC ATG ATG TCC TCT GCT CAG TTC CTT GGT	51
Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly	
-20 -15	
CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA GGT ACC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA	99
Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr	
-10 -5 1 5	
CAG ACT GCA TCC TCC CTG CCT GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC	147
Gln Thr Ala Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile	
10 15 20	
AGT TGC AGT GCA AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAA	195
Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln	
25 30 35	
CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC TTT TAC TCA TCA AAT	243
Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Ser Ser Asn	
40 45 50	
TTA CAC TCG GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC GGT GGG TCC GGG ACA	291

43  
 Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr  
 55 60 65  
 GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AAC CTG GAG CCT GAA GAT ATT GCC ACT 339  
 Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr  
 70 75 80 85  
 TAC TTT TGT CAT CAG TAT AGT AAG CTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC 387  
 Tyr Phe Cys His Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly  
 90 95 100  
 ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG 408  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 105

【0133】配列番号： 6

配列の長さ： 35

配列の型： 核酸

\* 鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

\* 配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

AATTCACC ATG GAG TTT GGG CTC AGC TGG CTT TTT 35  
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe

【0134】配列番号： 7

配列の長さ： 43

配列の型： 核酸

※ 鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

※20 配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

CAA GGT ACC ACG TTA ACT GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC C 43  
 Gln Gln Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

【0135】配列番号： 8

配列の長さ： 61

配列の型： 核酸

★ 鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

★ 配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

AG CTT CCA TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGA ACT 50  
 Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 GTG GCT GCA CC  
 Val Ala Ala 61

## 【図面の簡単な説明】

【図1】は9.3kbのKM50細胞の染色体DNAのXba I断片の制限酵素切断地図を示した図である。

【図2】はプラスミドpKMB11の造成工程を示した図である。

【図3】はプラスミドpKMD6の造成工程を示した図である。

【図4】はプラスミドpEPKMA1の造成工程を示した図である。

【図5】はプラスミドpEPKMB1の造成工程を示した図である。

【図6】はプラスミドpAGE501の造成工程を示した図である。

【図7】はプラスミドpAGE109の造成工程を示した図である。

【図8】はプラスミドpAGE502の造成工程を示した図である。

【図9】はプラスミドpAGE503の造成工程を示した図である。

【図10】はプラスミドpSEd1の造成工程を示した図である。

【図11】はプラスミドpSE1D2の造成工程を示した図である。

【図12】はプラスミドpIG1SE1d2の造成工程を示した図である。

【図13】はプラスミドpIG1SE1d3の造成工程を示した図である。

40 【図14】はプラスミドpIG1SE1d4の造成工程を示した図である。

【図15】はプラスミドpPMOL2の造成工程を示した図である。

【図16】はプラスミドpPMOL3の造成工程を示した図である。

【図17】はプラスミドpchCKA7の造成工程を示した図である。

【図18】はプラスミドpchCKB1の造成工程を示した図である。

50 【図19】はプラスミドpckCKC1の造成工程を示した図

である。

【図 20】はプラスミド pChiIgHB2 の造成工程を示した図である。

【図 21】はプラスミド pChiIgLA1 の造成工程を示した図である。

【図 22】はプラスミド pKM641HA3 および pKM641LA2 を示した図である。

【図 23】はプラスミド pChi641HA1 を示した図である。

【図 24】はプラスミド pKM641HE1 の造成工程を示した図である。

【図 25】はプラスミド pKM641HF1 の造成工程を示した図である。

【図 26】はプラスミド pChi641HA1 の造成工程を示した図である。

【図 27】はプラスミド pChi641HAM1 の造成工程を示した図である。

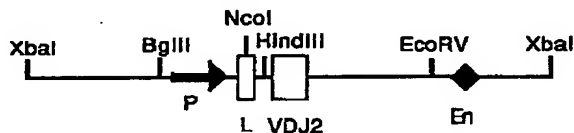
【図 28】はプラスミド pChi641LG11 を示した図である。

【図 29】はプラスミド pChi641LG11 の造成工程を示した図である。

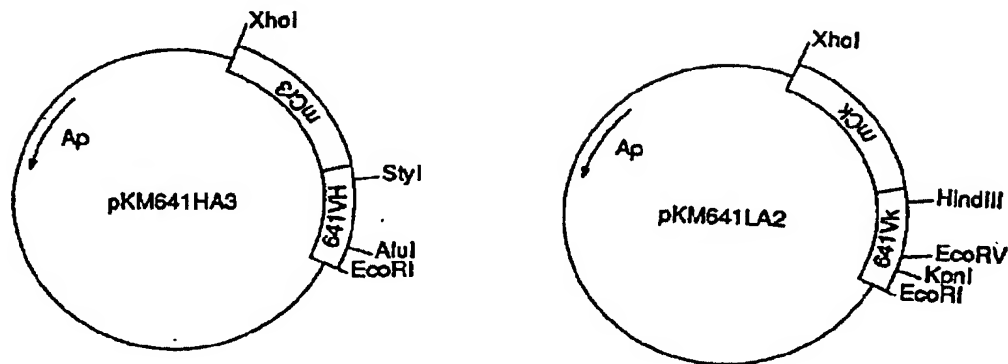
【図 30】はプラスミド pChi641LGM11 の造成工程を示した図である。

【図 31】は精製した抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体 KM-871 (約 5  $\mu$ g/レーン) の SDS-PAGE (4-15% グラジエントゲル使用) のパターンを示した図である。左より、分子量マーカー、ヒト IgG スタンダード、マウス抗GD<sub>3</sub> 抗体 KM-641、抗GD<sub>3</sub> キメラ抗体 KM-871 の泳動パターンをそれぞれ示し \*

【図 1】



【図 22】



\* た。Aは還元条件で電気泳動を行った図であり、Bは非還元条件下で電気泳動を行った図である。

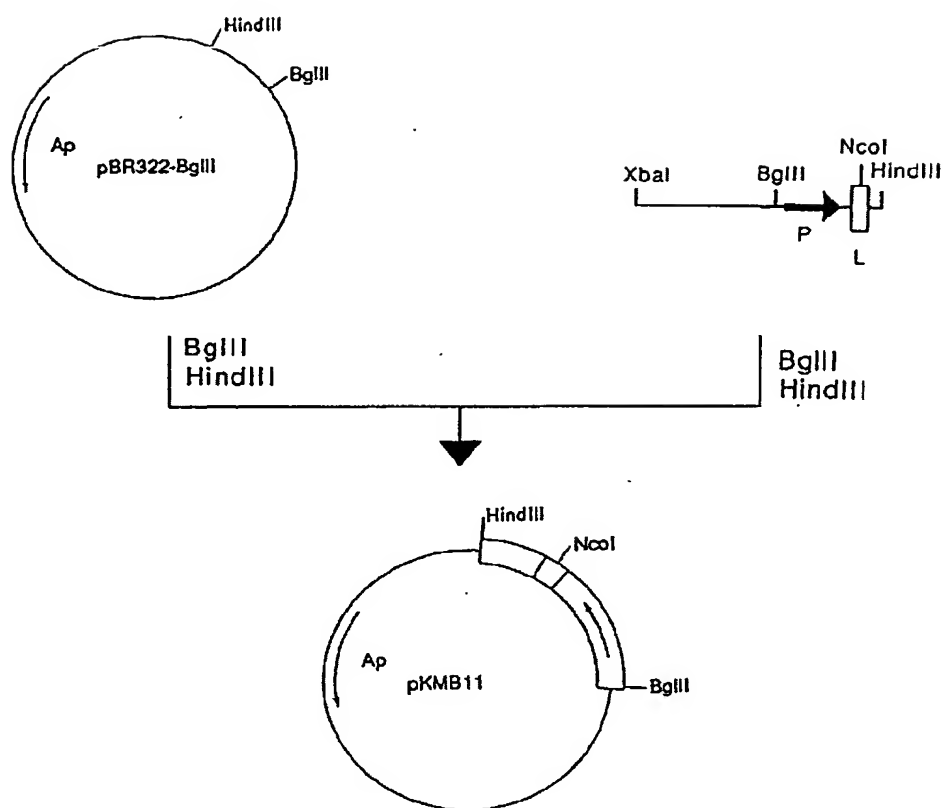
【図 32】は蛍光抗体法によるガングリオシドGD<sub>3</sub> 陽性細胞 G361 および SK-MEL-28 に対する KM-871 の反応性を示した図である。縦軸は細胞数を、横軸は蛍光強度をそれぞれ示す。点線は抗体無添加での反応性を、実線は KM-871 添加での反応性をそれぞれ示す。

【図 33】はガングリオシドGD<sub>3</sub> 陽性細胞 G361 および SK-MEL-28 に対する KM-871 の CDC 活性を示した図である。縦軸は CDC 活性を、横軸は添加した抗体濃度をそれぞれ示す。黒のカラムは、KM-871 の CDC 活性を、斜線のカラムは KM-641 の CDC 活性をそれぞれ示す。

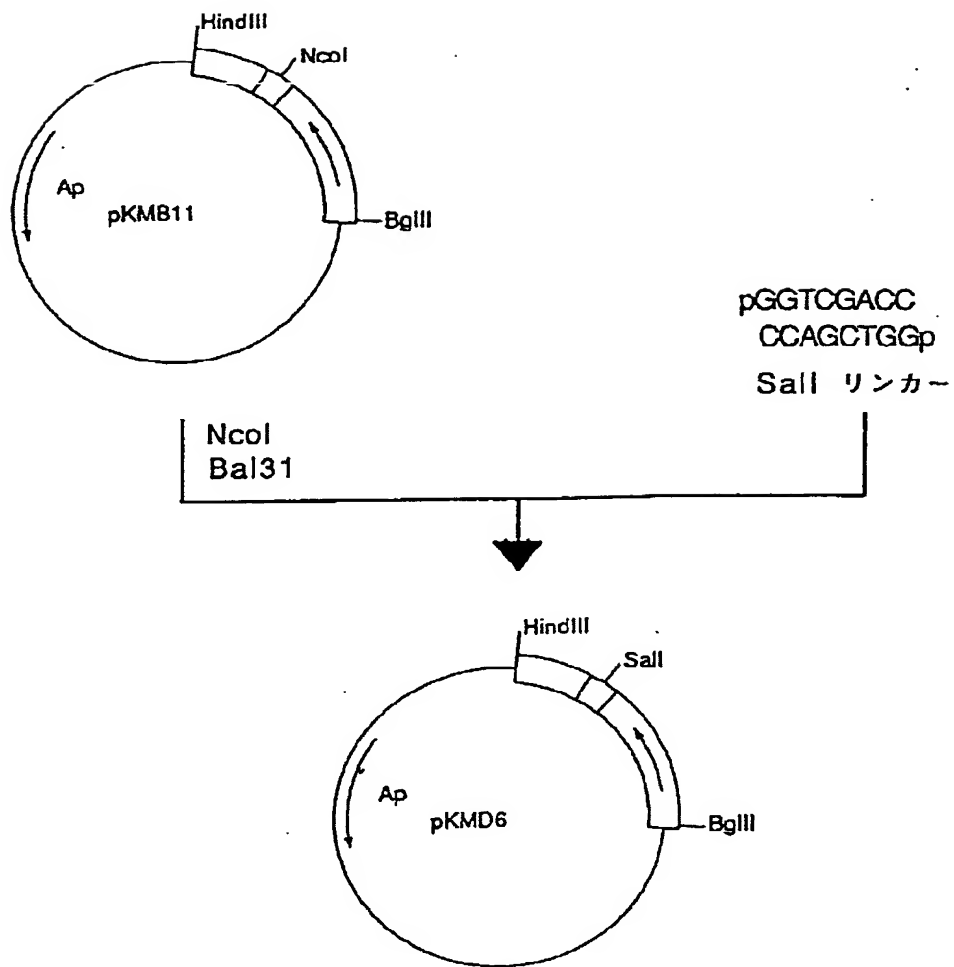
【図 34】はガングリオシドGD<sub>3</sub> 陽性細胞 G361 に対する ADCC 活性を示した図である。横軸は ADCC 活性を、縦軸はエフェクター細胞およびエフェクター細胞と標的細胞の数の比をそれぞれ示す。黒のカラムは KM-871 の ADCC 活性を、斜線のカラムは KM-641 の ADCC 活性を、灰色のカラムは抗体無添加の ADCC 活性をそれぞれ示す。

【図 35】は移植腫瘍に対する抗腫瘍効果を示した図である。縦軸は腫瘍体積、横軸は腫瘍移植後の日数をそれぞれ示す。黒丸は AMC-462 投与群、白四角は KM-641 投与群、白三角は KM-871 投与群をそれぞれ示す。

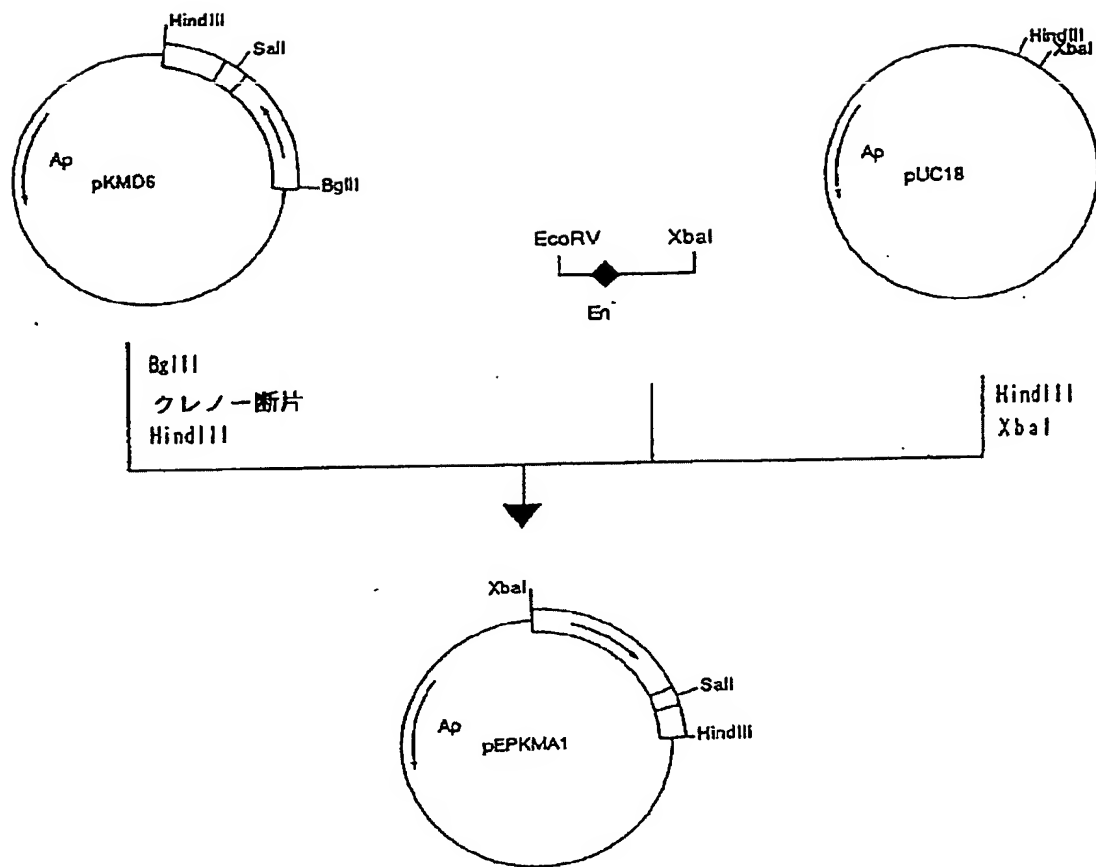
【図 2】



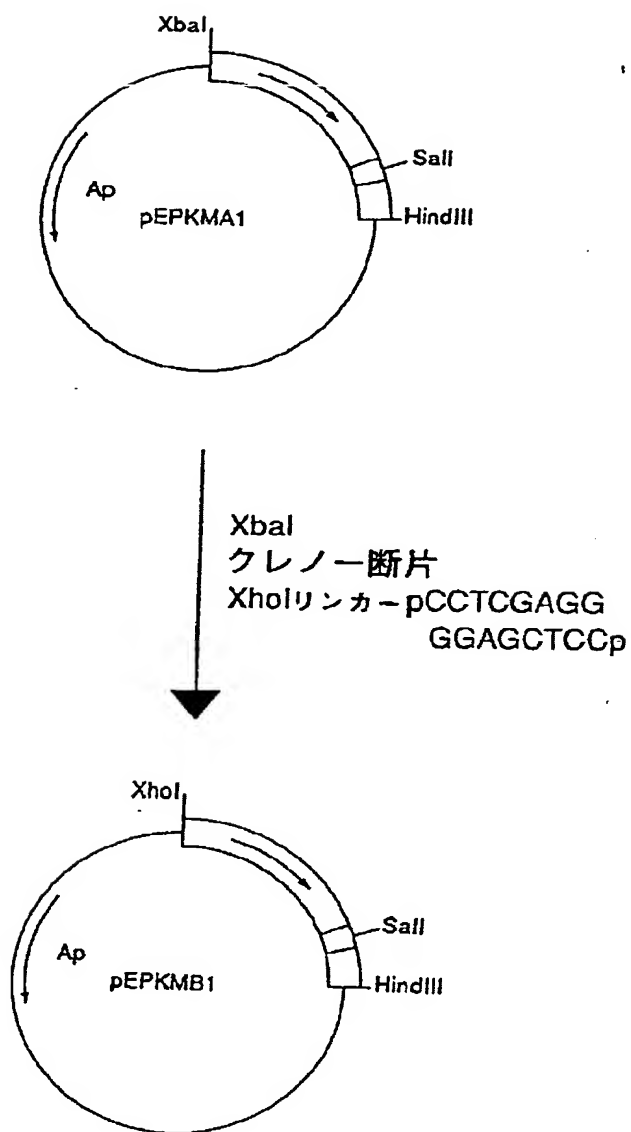
【図3】



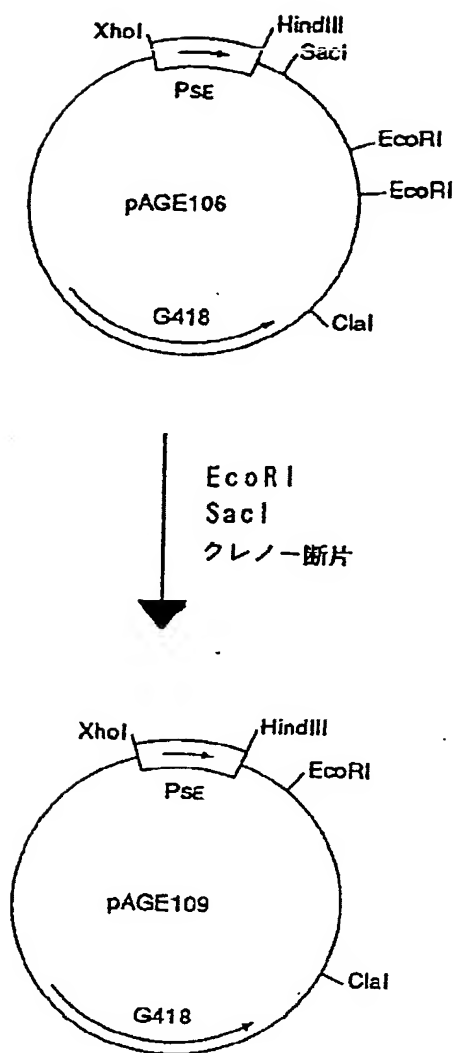
【 図 4 】



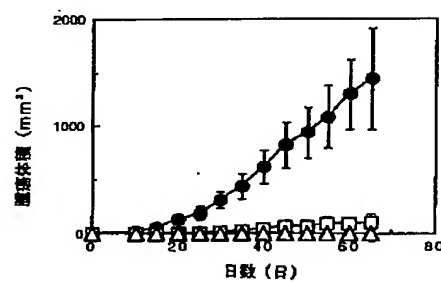
【図5】



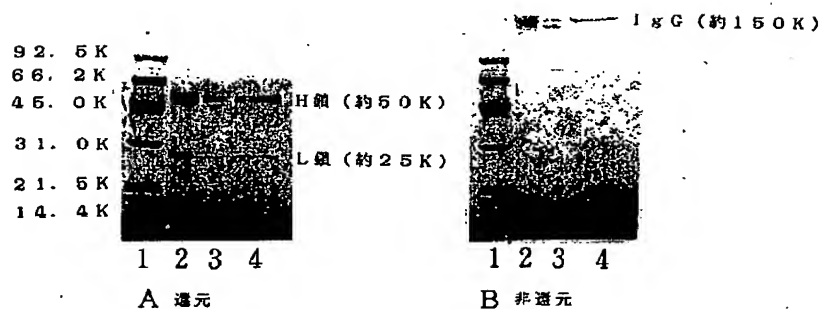
【図7】



【図35】

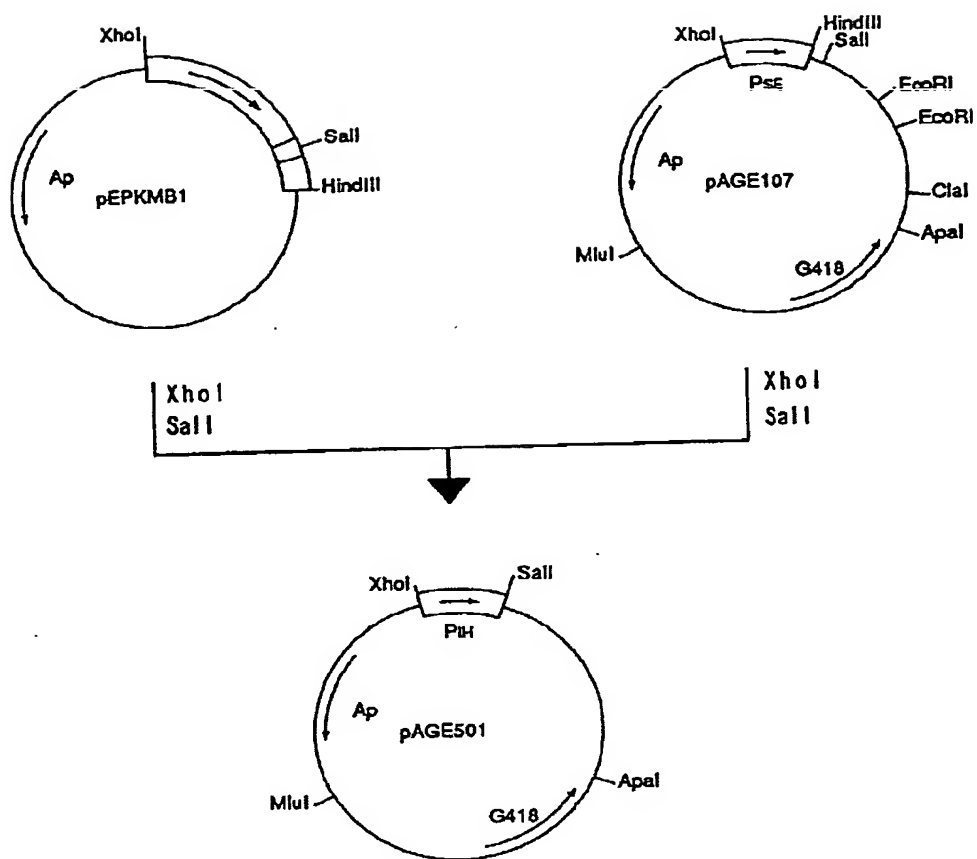


【図31】

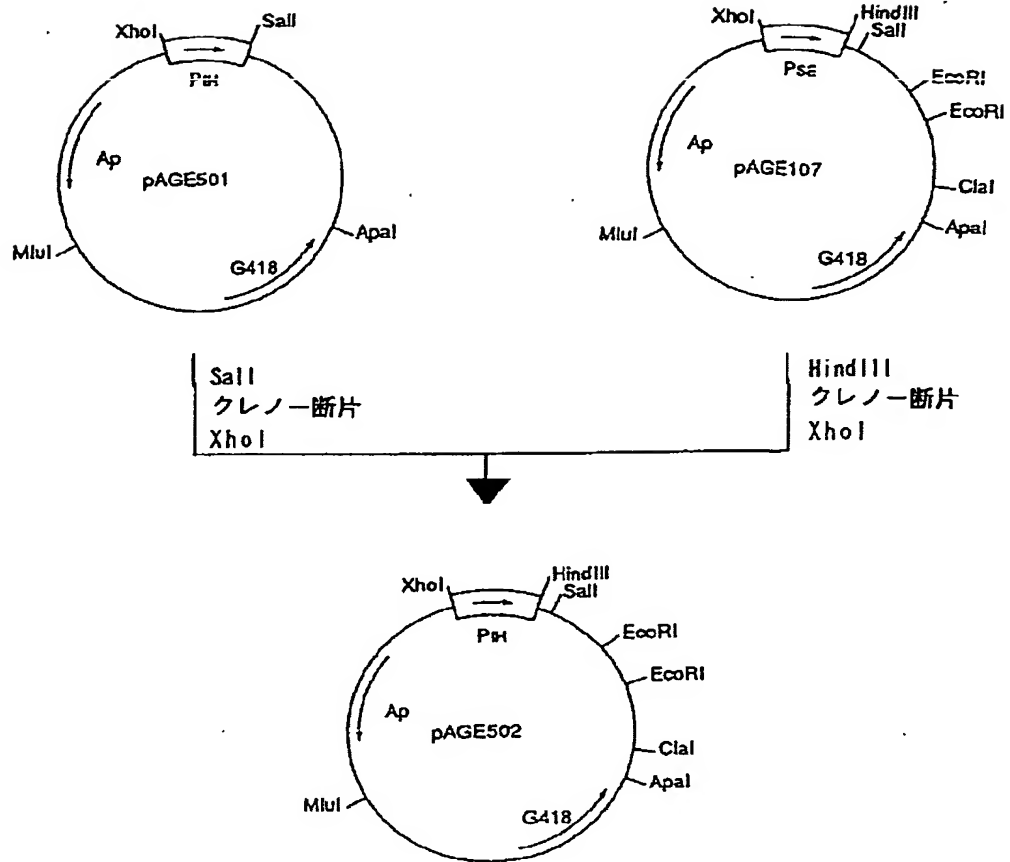




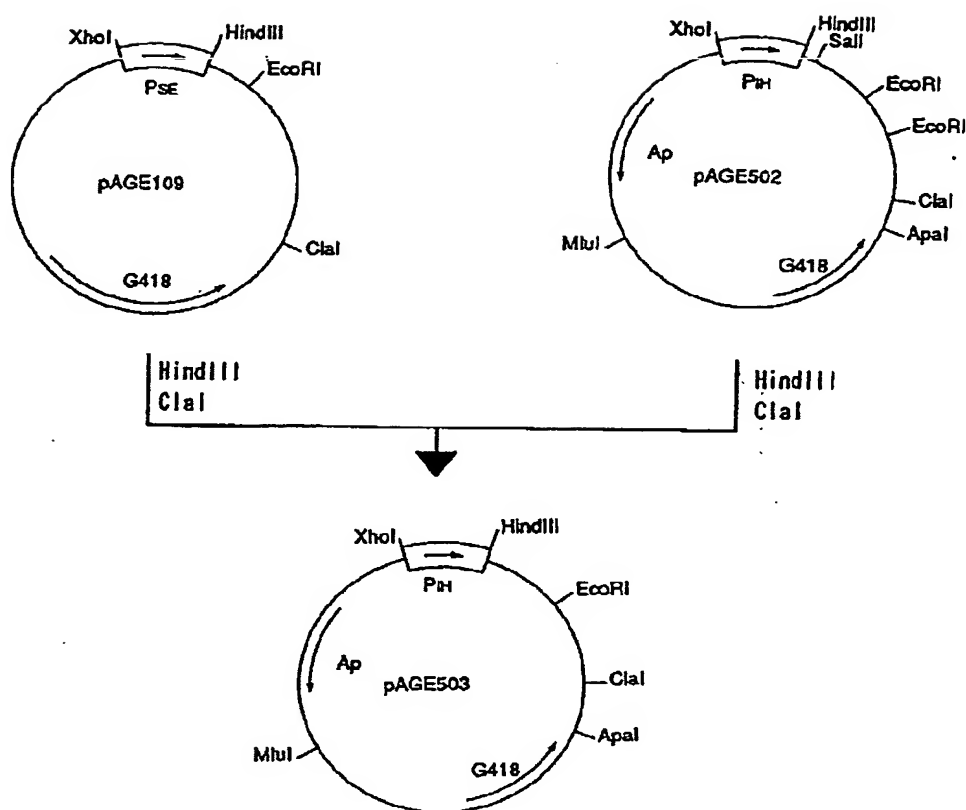
【図6】



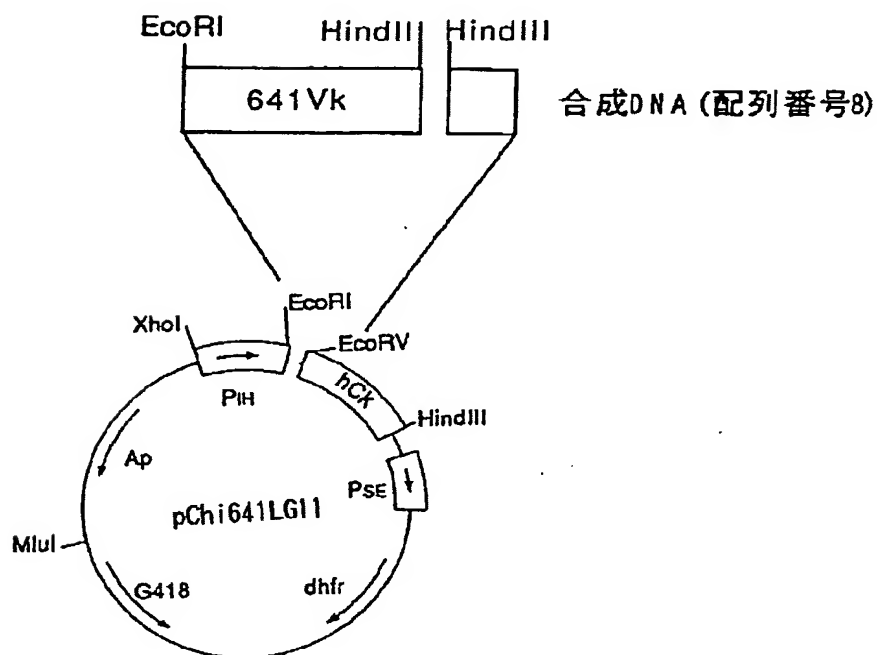
【図8】



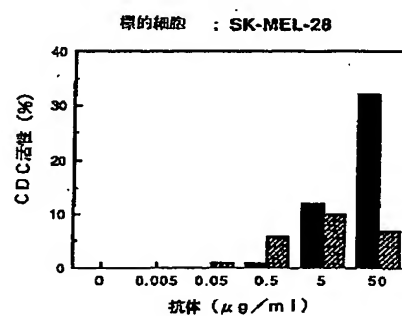
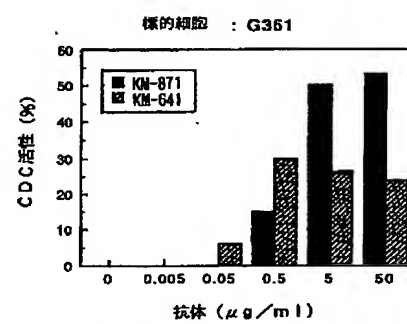
【図9】



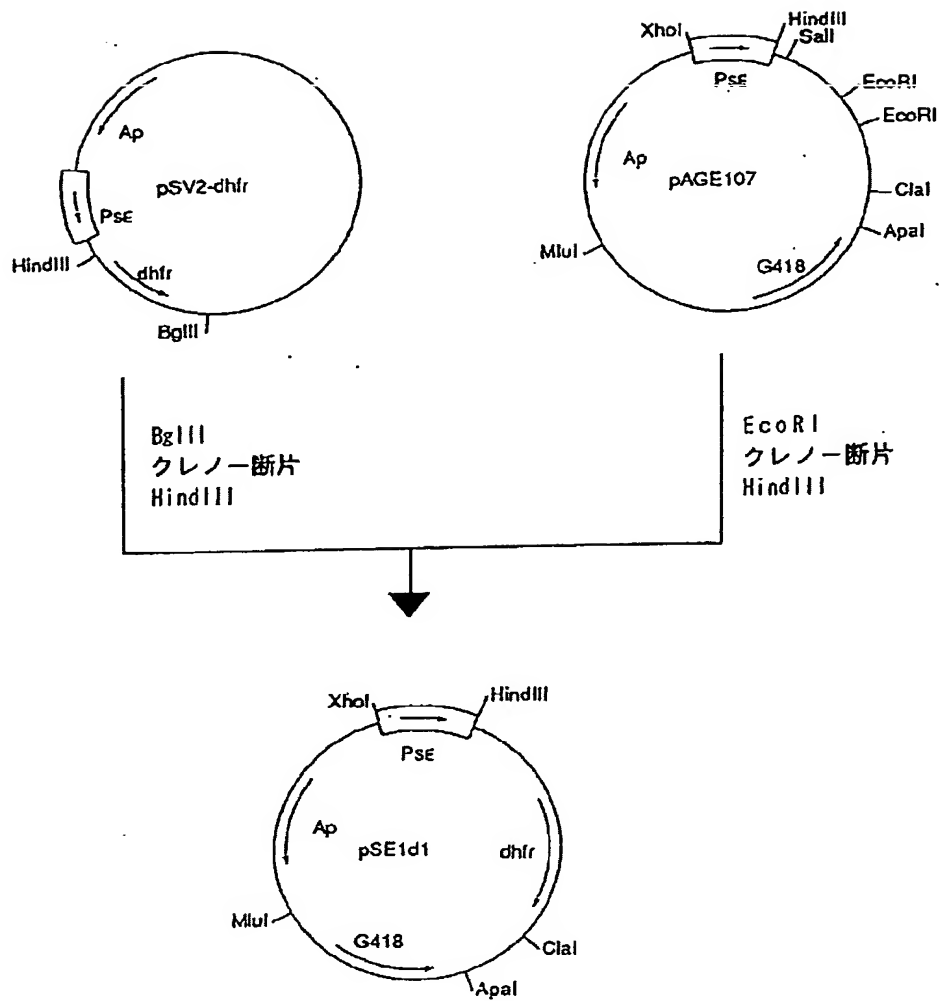
【図28】



【図33】

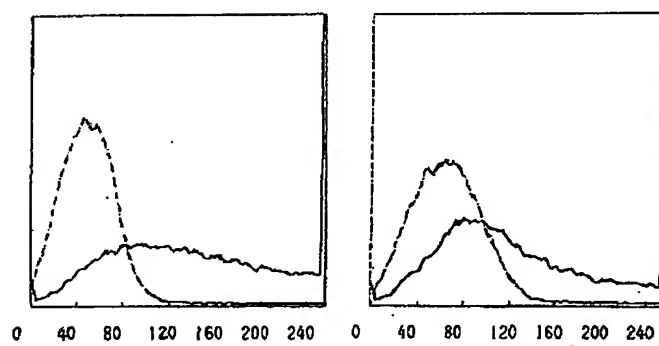


【図10】

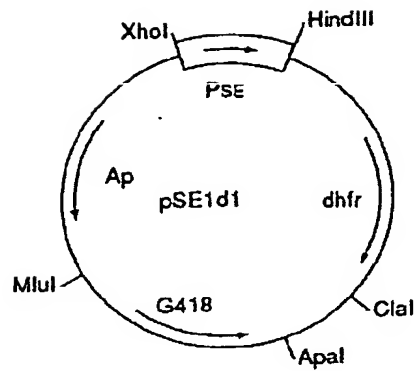


【図32】

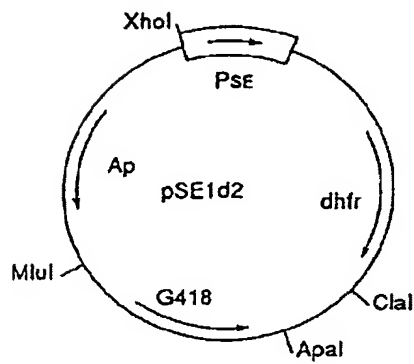
メラノーマSK-MEL-28 (GD3+)      メラノーマG361 (GD3+)



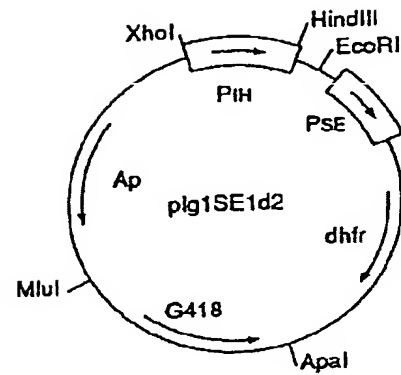
【図11】



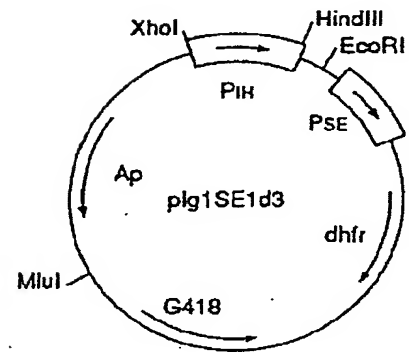
HindIII  
クレーン断片



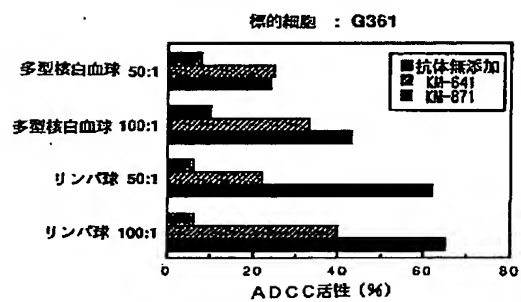
【図13】



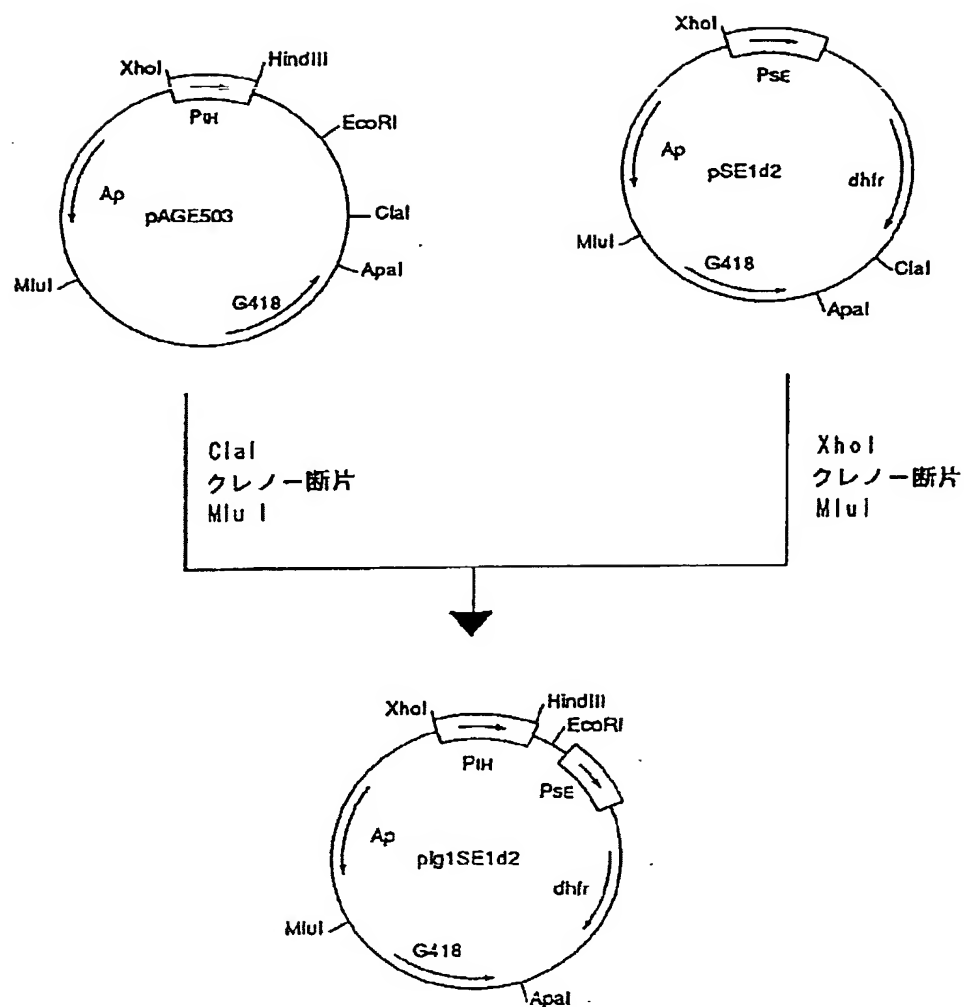
ApaI  
クレーン断片



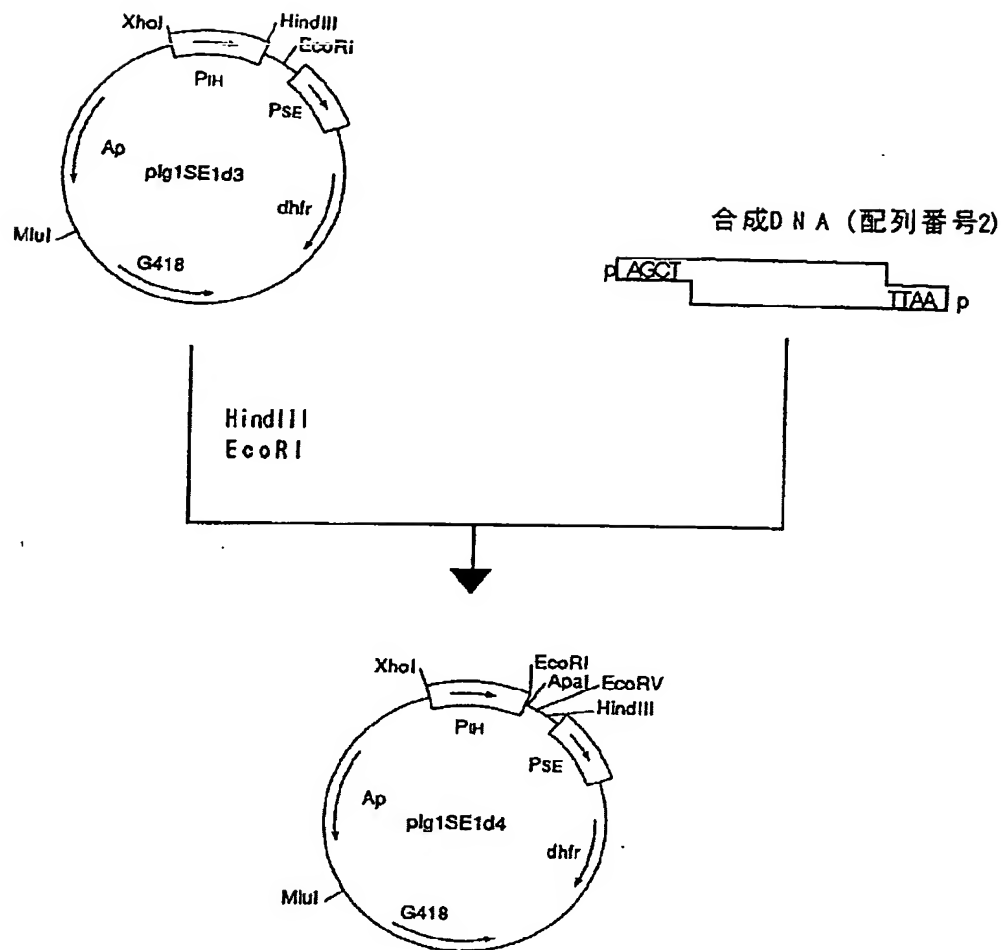
【図34】



【図 1 2】

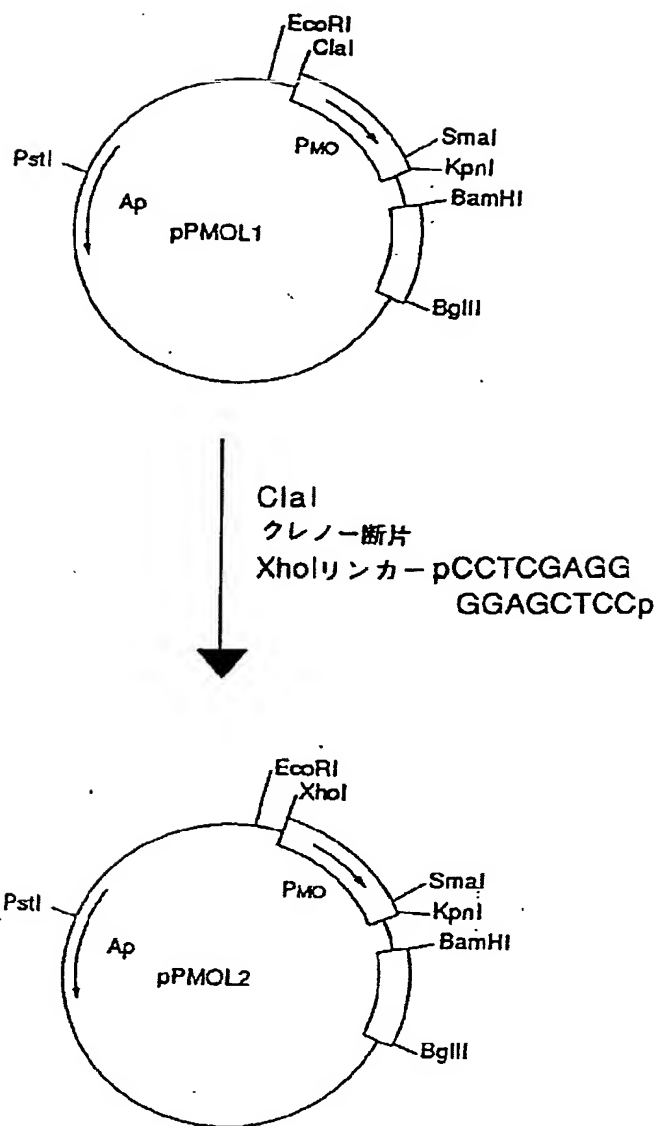


【図14】

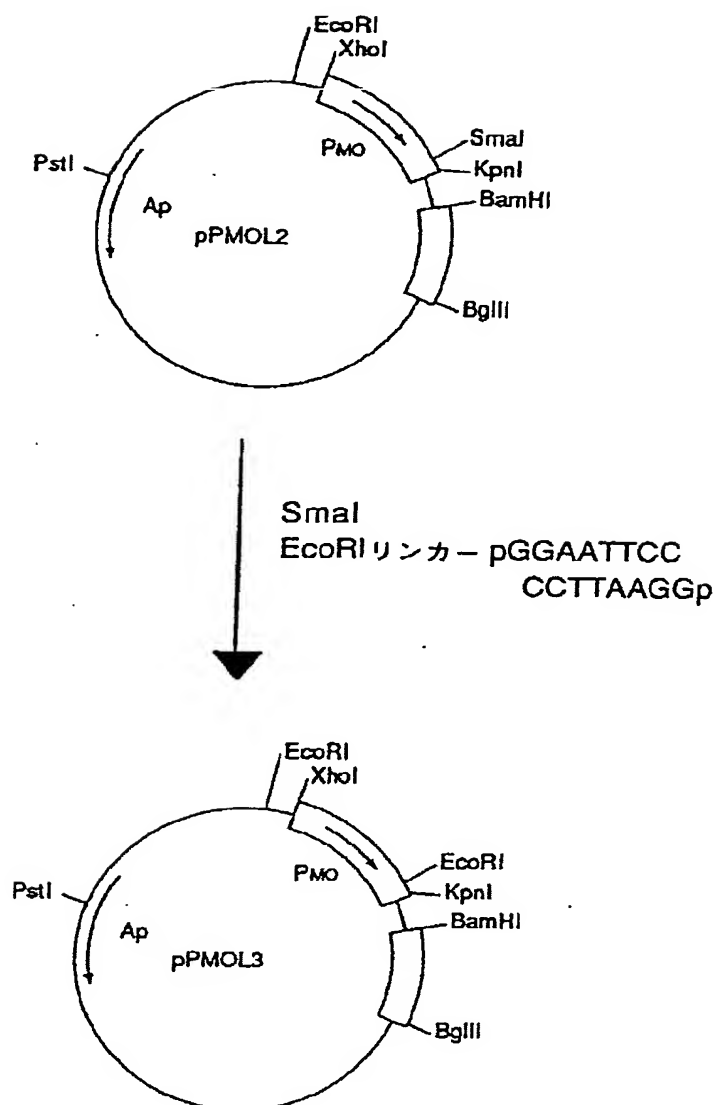




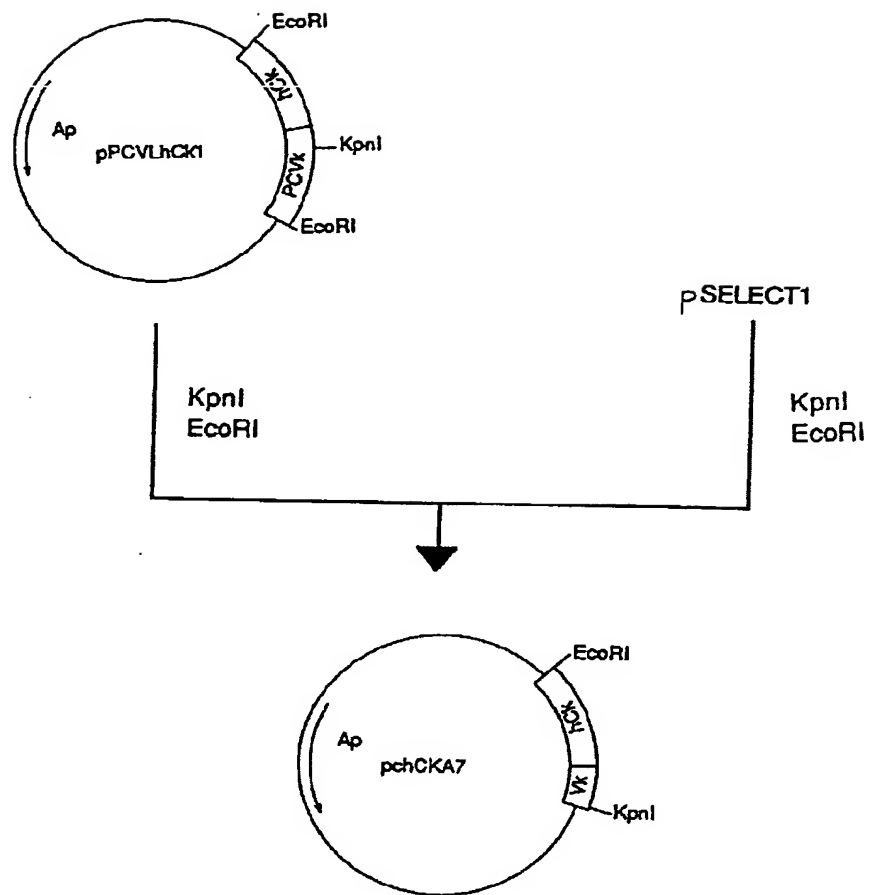
【図15】



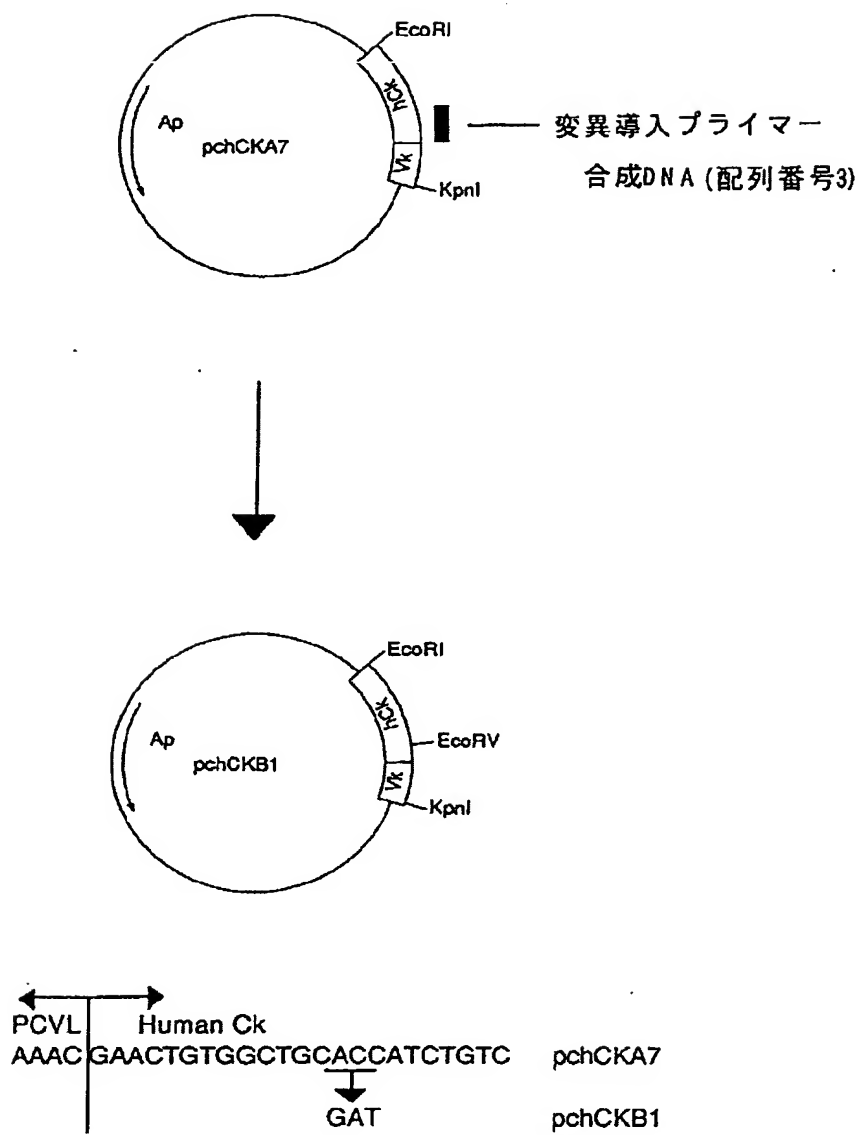
【図16】



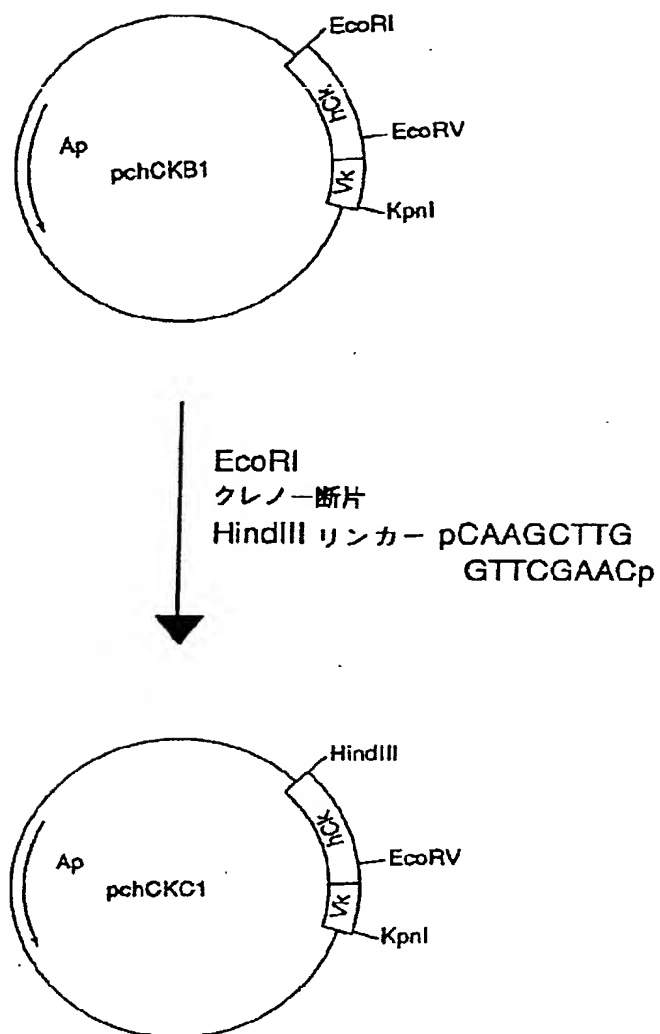
【図17】



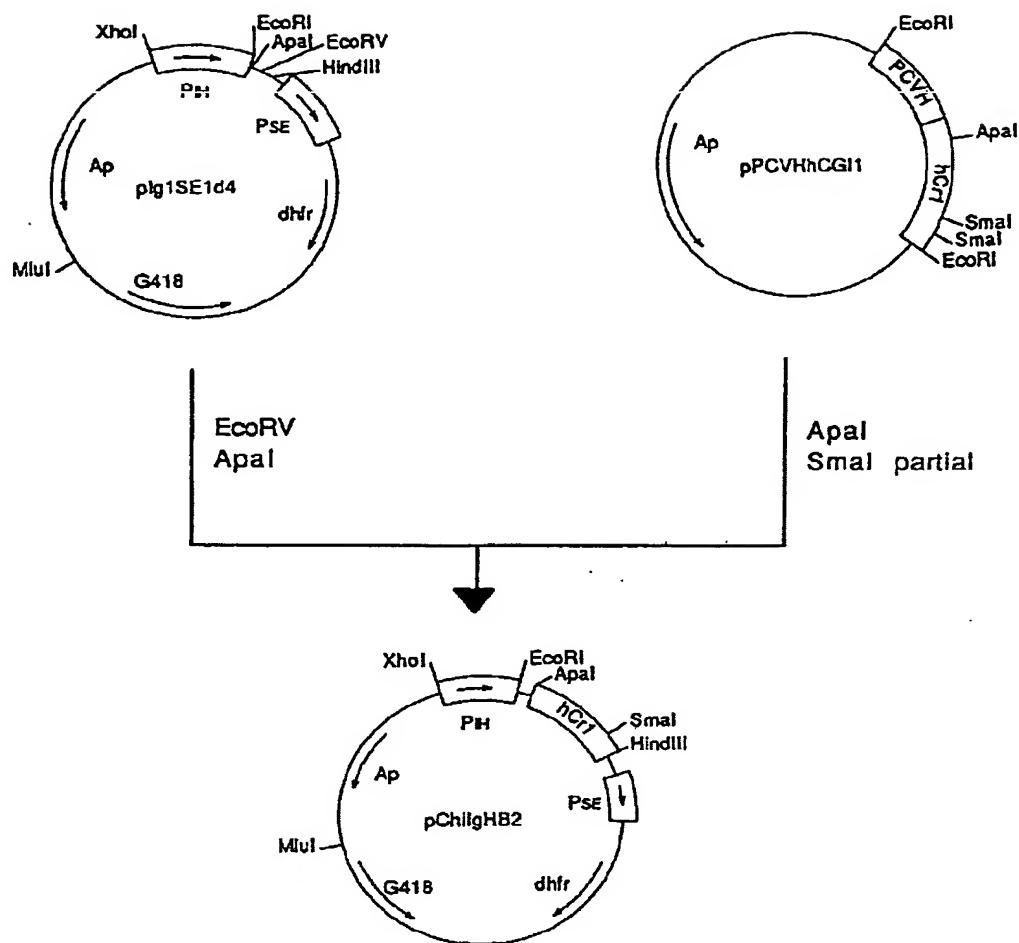
【図18】



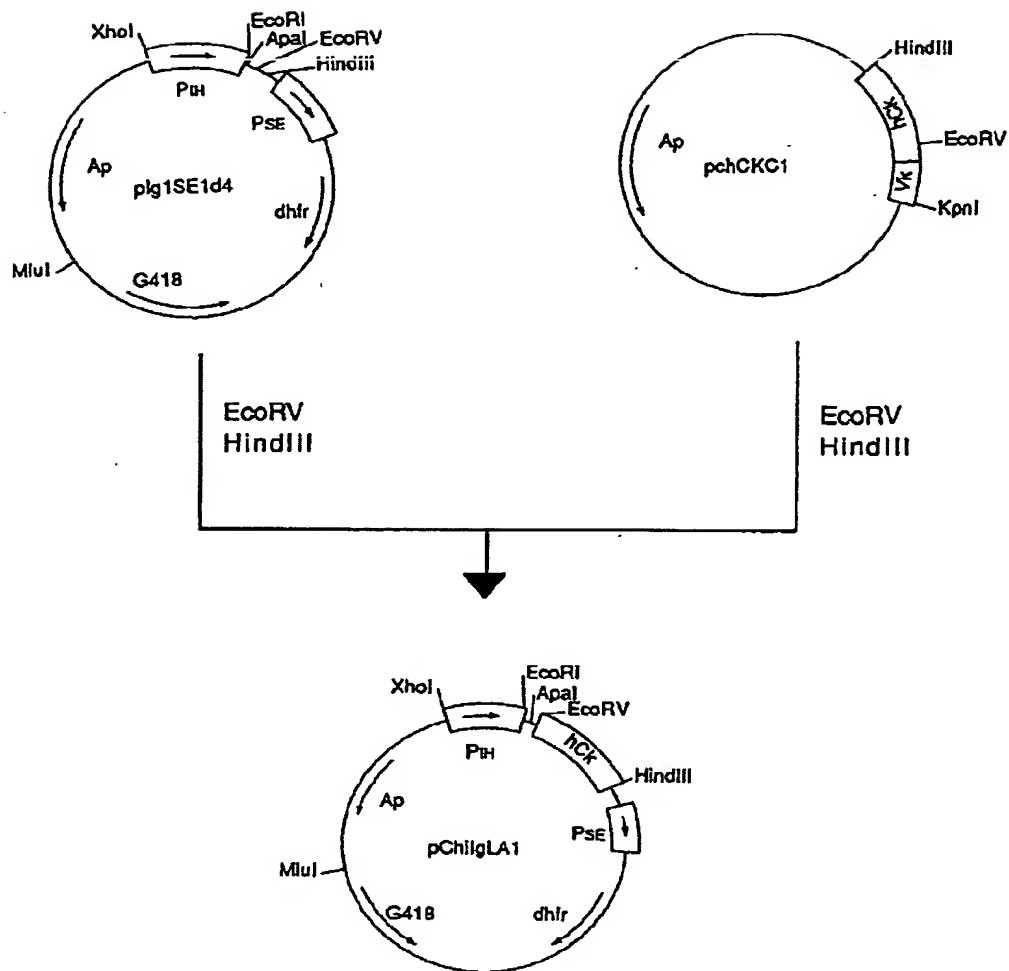
【図19】



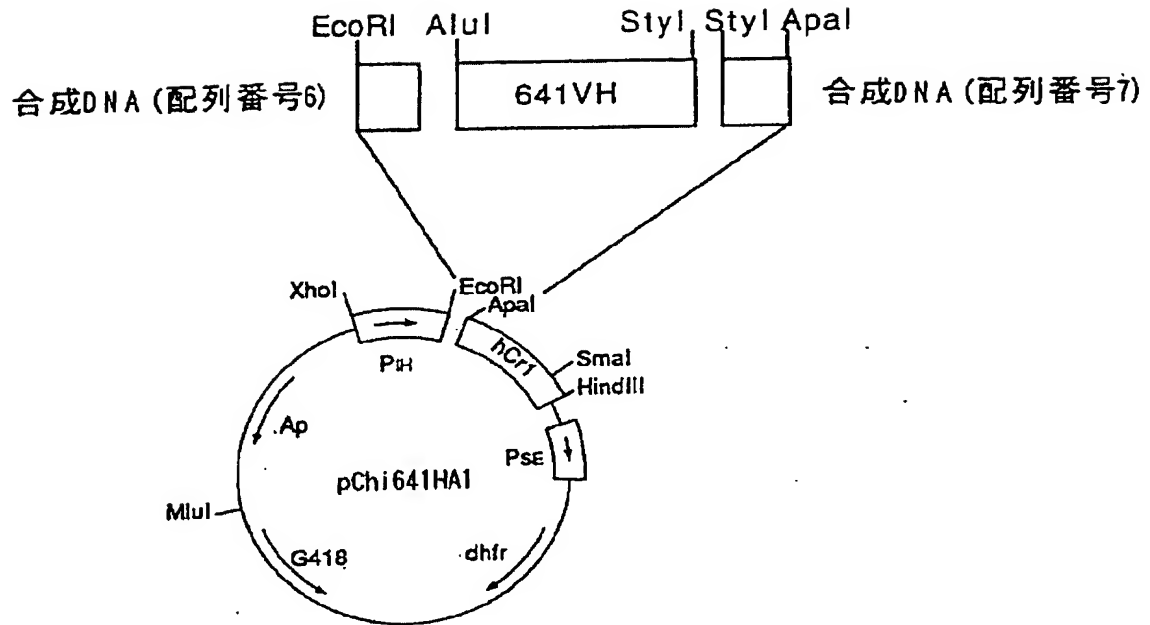
【図20】



【図21】

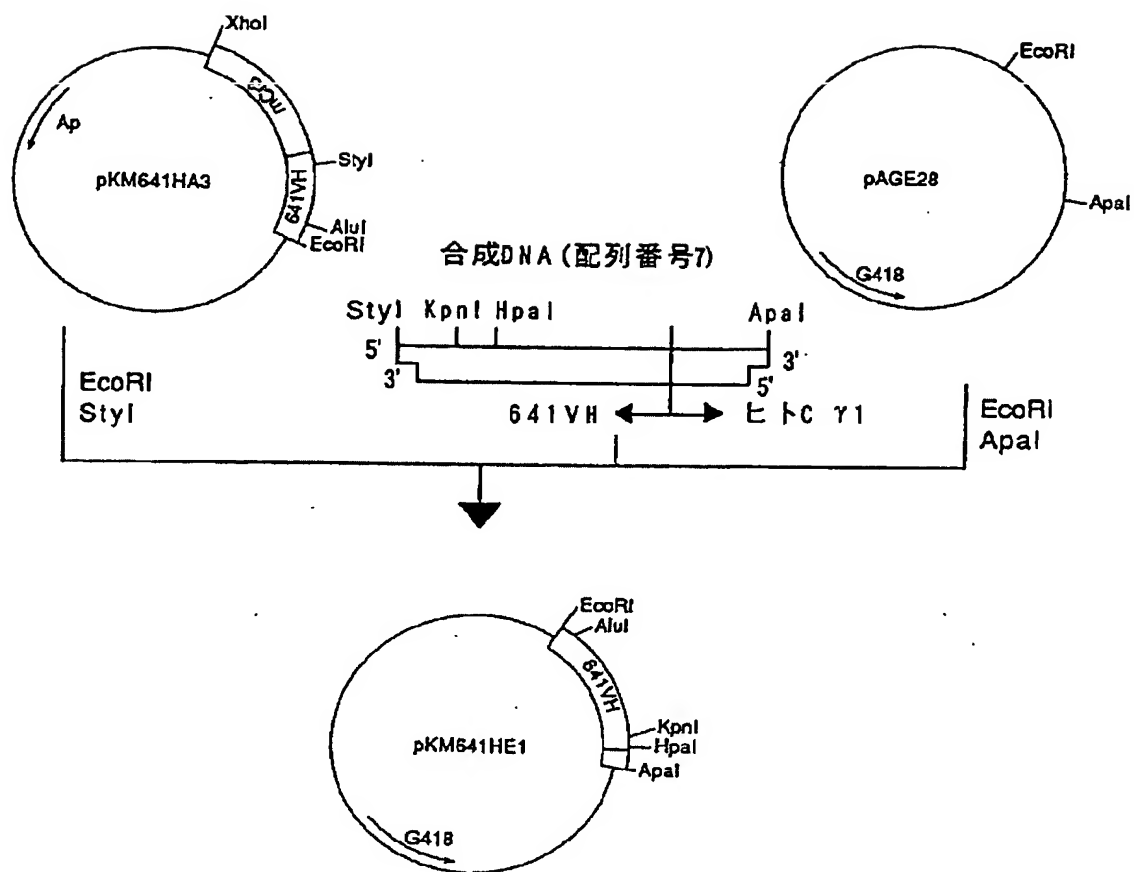


【図23】

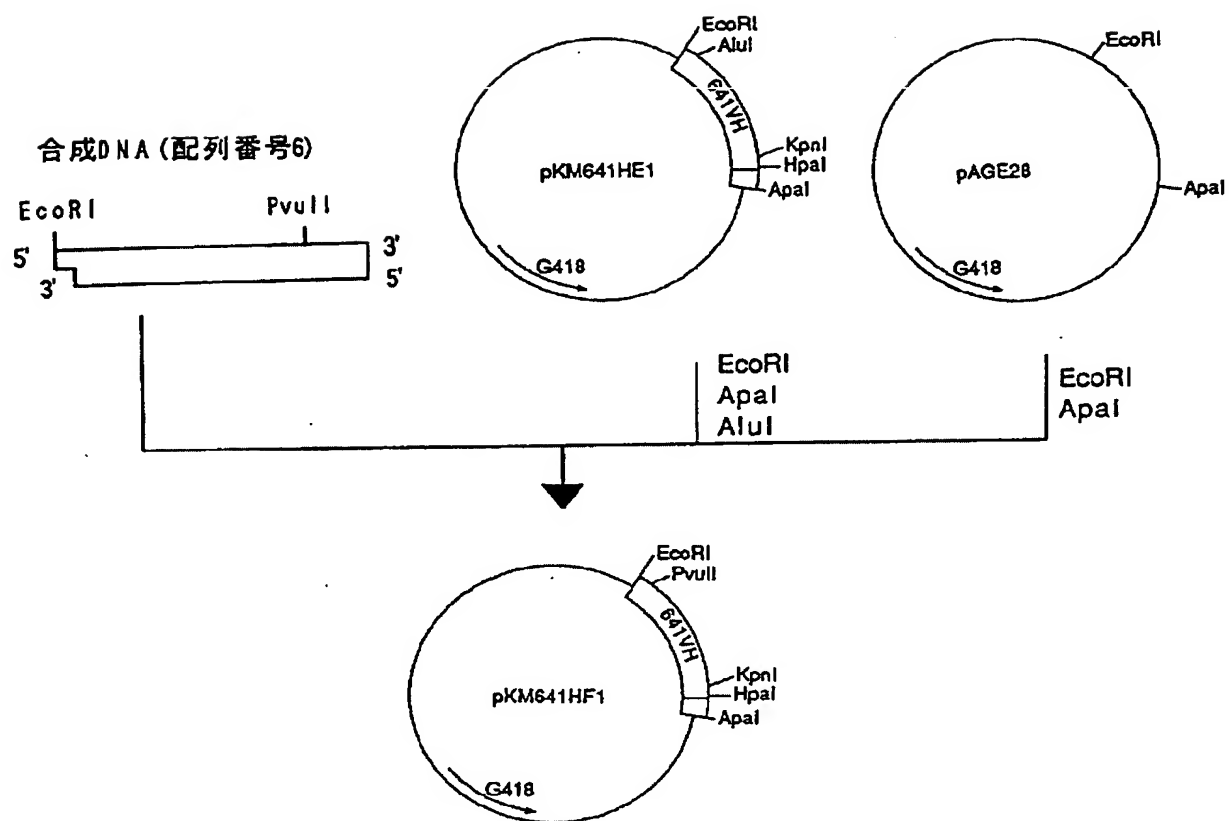




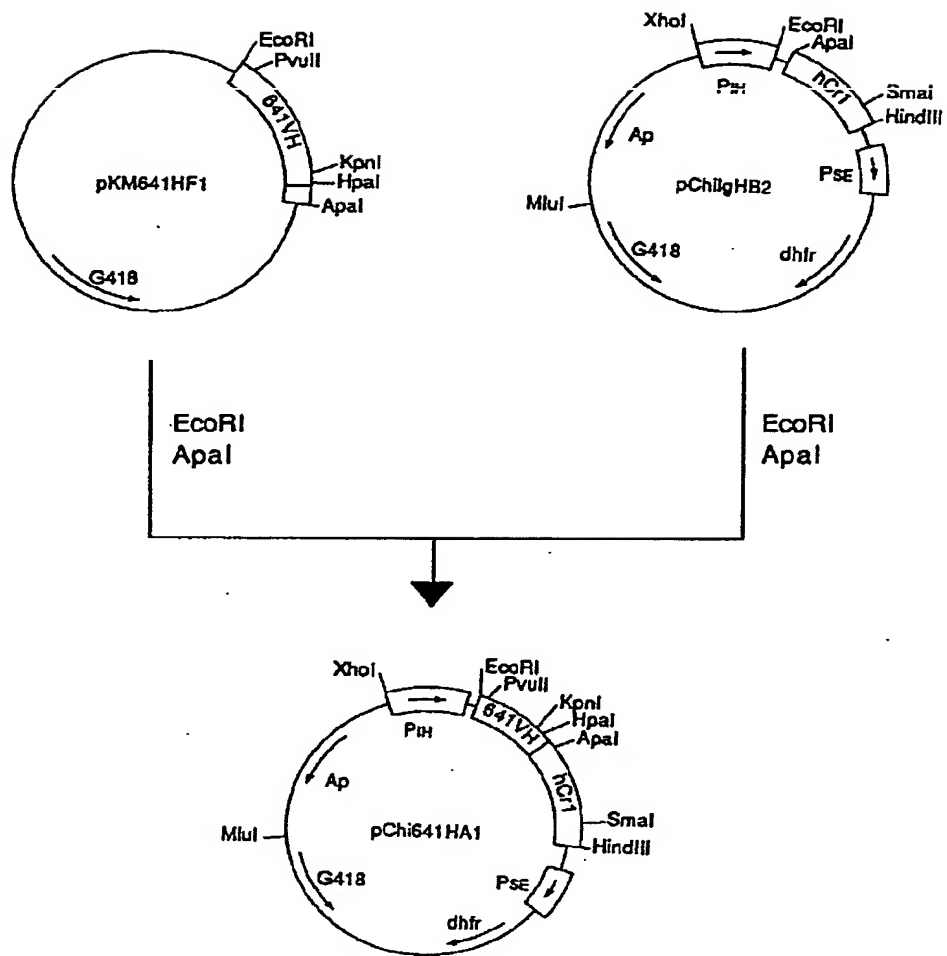
【図24】



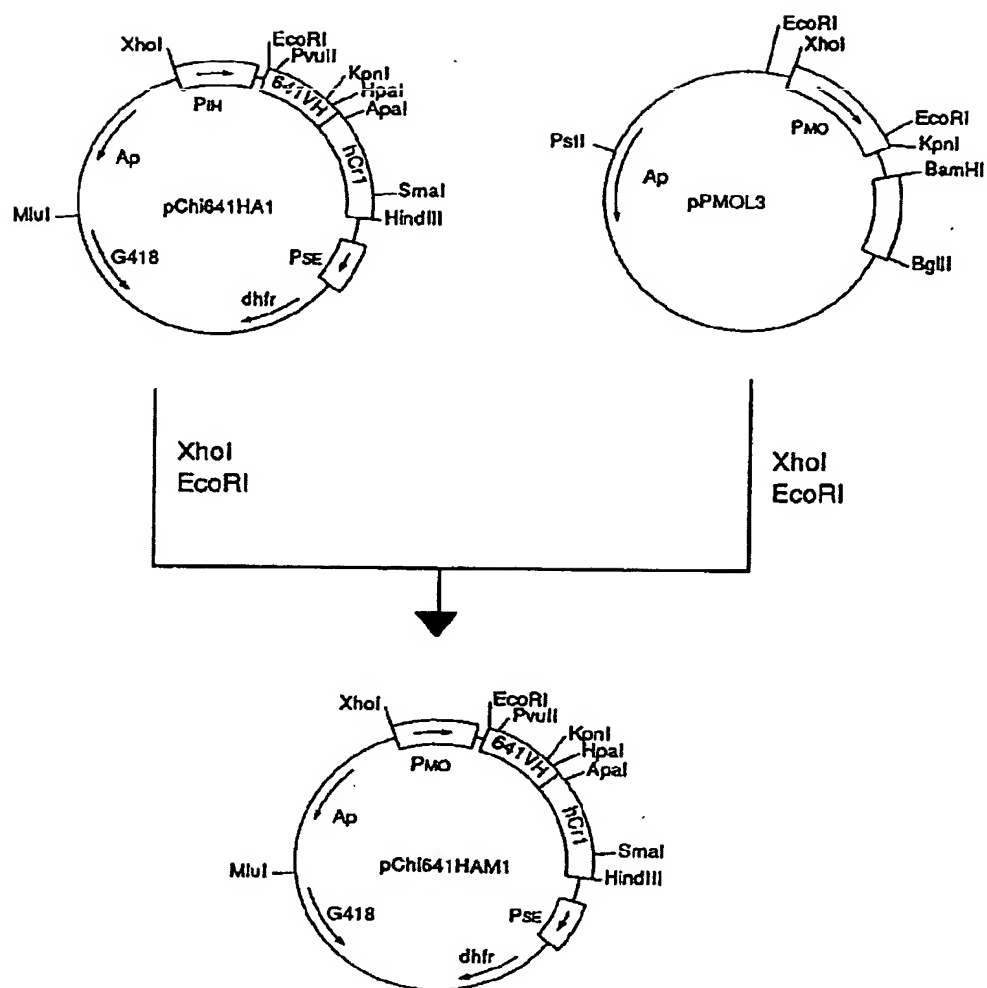
【図 2 5】



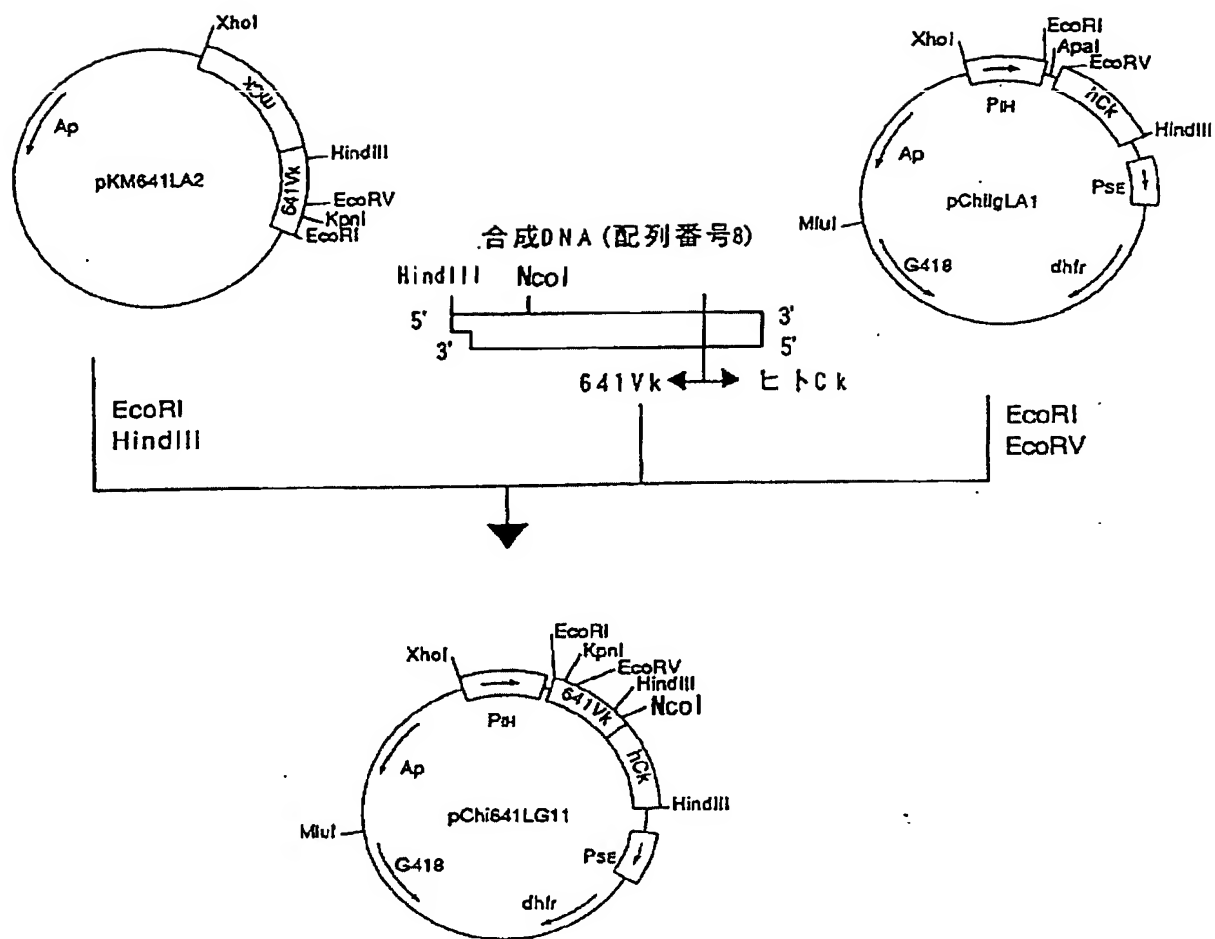
【図26】



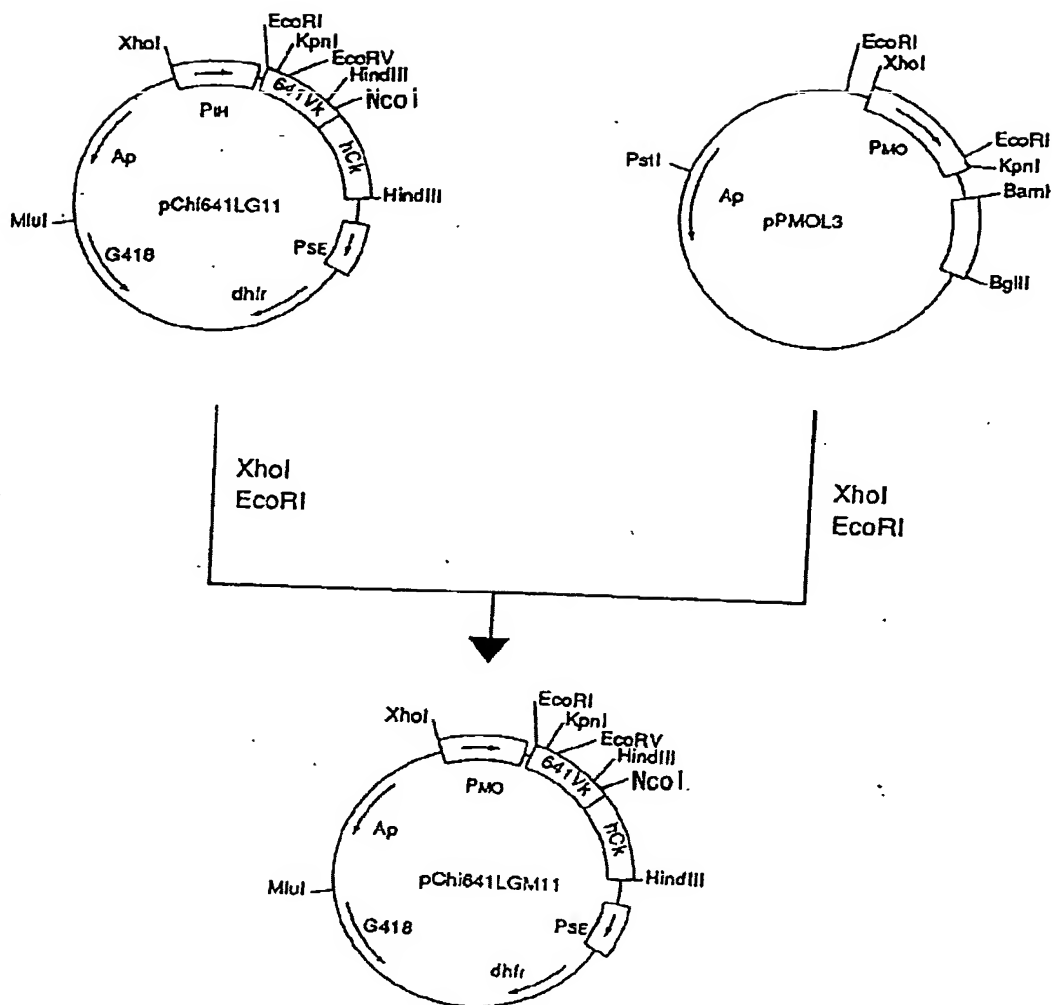
【図27】



【図29】



【図30】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/13				
15/62				
// C 0 7 K 7/06	Z N A Z	8318-4H		
7/08		8318-4H		
13/00		8619-4H		
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				
C 0 7 K 99:00				